

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT
N° d'ordre : 653

Thèse

Présentée à l'Université Blaise PASCAL
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire
(Endocrinologie Moléculaire et Cellulaire)

Présentée et soutenue publiquement
par

Marine BAPTISSART

le 12 décembre 2014

**Impacts de concentrations supraphysiologiques d'acides biliaires
sur la physiologie testiculaire et les fonctions de reproduction.**

Président : Pr. Patrick VERNET, EA4645, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand

Rapporteurs : Dr. Déborah BOURC'HIS, INSERM U934/CNRS UMR 3215, Paris
Dr. Bernard JÉGOU, INSERM U1085/IRSET, Rennes

Examineurs : Dr. Charles THOMAS, UMR 866 INSERM/Univ. de Bourgogne, Dijon
Dr. Laurent DUBUQUOY, INSERM U995, Lille

Directeur de thèse : Dr. David VOLLE, GReD/INSERM U1103/CNRS UMR 6293, Clermont-Ferrand

Remerciements

Je remercie sincèrement les docteurs Déborah BOURC'HIS et Bernard JÉGOU d'avoir accepté de considérer mes travaux de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également les docteurs Charles THOMAS et Laurent DUBOQUOY, tous deux examinateurs, pour l'investissement dont ils ont fait preuve dans l'évaluation de ce travail de thèse. Enfin merci au professeur Patrick VERNET de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury. Pour le temps précieux que chacun de vous a pu accorder à la lecture attentive de ce manuscrit, merci.

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le docteur David Volle. Merci pour la confiance que tu as pu m'accorder pour la réalisation de ce projet de recherche. Tu as su quotidiennement et sans mesure apporter toute l'attention et le soutien nécessaire à l'avancée de nos travaux tout en laissant libre cours à mes initiatives. La justesse de cet équilibre formateur m'a été précieuse. J'ai beaucoup appris à tes côtés et t'en suis reconnaissante. Merci pour les concepts scientifiques de l'Ih30. Tout d'abord redoutés de part leur intensité et la rigueur qu'ils imposaient, ils m'ont poussée à me surpasser avec la volonté quotidienne de te surprendre. Je tiens également à te remercier de m'avoir confortée et soutenue dans mes souhaits de carrière. Je suis aujourd'hui fière du travail accompli et espère porter dignement vers d'autres horizons ce que tu m'as transmis. Aussi, je tiens à te remercier pour la discrétion affectueuse, respectueuse et complice que nous avons entretenue durant ces années.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe LXR passés et présents : Jean-Marc, Silvère, Françoise, Amalia, Florence, Aurélie, Lauriane, Hugues, Christine, Christine, Sandra, Emmanuelle, Salwan, Emilie, Julie, Aurélien, Anthony, Candice, Olivier, Bagora, Anissa, Betty, Jean-Jo, Allan, Nada, Delphine.

Jean-Marc, merci de m'avoir accueillie avec tant de générosité dans cette équipe qui te doit sa singularité ! Merci de t'être rendu disponible pour la relecture minutieuse de mes écrits ; « à la virgule près », cette formule t'est consacrée ! Merci pour les crêpes et pâtisseries des matins de réunions ; pour le confort visuel, notion que l'on a travaillée au quotidien et sans relâche ; pour les saucisses rue de Luc... transition choisie qui me mènera à te remercier pour ta maîtrise de l'humour fin et délicat ; je me suis d'abord surprise à en rire, aujourd'hui je sais qu'il me manquera.

Merci à mes « tontons maléfiques »,

Silvère, Chercheur d'argent, je te remercie pour tes conseils précieux et ta rigueur ; j'ai appris à la savoir bienveillante et méritée. Merci d'avoir joué le jeu de nos moments complices pleins d'ironie et de dérision.

Pierre, merci pour ta disponibilité quel qu'en soit la nature. Merci pour ta précision scientifique et ton regard critique toujours juste et constructif à l'égard de mes travaux. Merci de m'avoir permis de partager avec toi ta passion pour la photographie.

Merci à Philippe A. pour l'attention prévenante que tu as toujours porté à mon épanouissement scientifique bien au delà de ce que ton rôle de membre de mon comité de thèse t'imposait. Je te suis infiniment reconnaissante de m'avoir accompagnée avec générosité, patience et passion dans le monde de l'épigénétique. Je n'oublierai pas : « Joyce c'est trop la classe et Marka c'est un dieu... ».

Claude, ton café le matin, ta proximité acoustique le jour, et ton *Willi Waller* du soir ont su éloigner Morphée de mon bureau au quotidien. Merci.

Françoise, merci pour ton aura féminine lumineuse et réconfortante ainsi que ton enthousiasme permanent sur lequel il fût bon de pouvoir compter.

Jean-Christophe, merci d'avoir été toujours fidèle au poste pour partager ensemble les moments d'ivresse scientifique !

Laurent, merci d'avoir éveillé mon intérêt pour la recherche. Je garderai le souvenir d'un professeur d'exception !

Fabrice, Ayhan, merci pour votre générosité, vos sourires et nos moments de complicité. Je suis ravie d'avoir croisé vos chemins.

Cyril, merci pour ta vision de *La pétanque à travers les âges* et autres œuvres volcaniques. Je les garderai précieusement en souvenir de ton humour fantaisiste !

Georges, merci d'avoir toujours porté une attention soignée à nos recherches. J'ai, grâce à nos discussions, pris la mesure de la responsabilité de mener à bien ce beau projet. J'en suis aujourd'hui fière.

Christian, merci d'avoir été là au tout début de cette aventure. Ton oreille attentive et ton soutien, notamment mathématique, m'ont été précieux.

Bertrand, Sandrine, merci d'avoir partagé mon aventure.

Marie-Jo, merci pour ta disponibilité, ton humour et ton sourire quotidien.

Gérard, Catherine, Laetitia, Marc, Sophie et Coralie, merci de m'avoir accompagnée pour ses premiers pas dans l'enseignement. Merci pour votre confiance, votre patience et votre gentillesse. J'ai appris et me suis surprise à aimer transmettre grâce à vous. Il me reste aujourd'hui des souvenirs chaleureux de cette expérience.

Aurélie, je ne saurais te remercier à la juste valeur de ce que toutes les marques d'attention que tu as eu à mon égard m'ont apportées. Je sais au combien tu as du faire preuve de patience ! Je t'en remercie. Nous sommes devenues si complices au cours de ces années. Merci pour ton soutien, pour les *Juke-Box* endiablés, tes rhums arrangés, ton rire si sincère, tes tartes au citron synonymes de réconfort pour le cœur comme pour les papilles. Je suis tellement heureuse d'avoir pu vivre à tes côtés la venue de votre jolie Léane. Je vous souhaite tant de belles choses !

Emmanuelle, ce fût un réel plaisir de partager avec toi cette aventure. Merci pour l'équilibre que nous avons su trouver ensemble. J'ai beaucoup appris de ta patience et du soin consciencieux que tu portes à la recherche. Merci pour l'intérêt et la précision scientifique dont tu as fait preuve lors de nos discussions quotidiennes. Ta discrétion et ton humour percutant forment un subtil et ravissant mélange ! Je suis fière d'avoir mené nos recherches à tes côtés.

Lauriane, ton arrivée au laboratoire m'a beaucoup apportée. Mes doutes et mes angoisses durant ces derniers mois n'ont pas eu raison de notre complicité ; merci d'avoir eu la patience de les écouter avec attention. Je suis ravie que notre petite équipe continue son chemin en ta compagnie. L'intérêt que tu as pu porter pour chacune de nos thématiques, l'investissement dont tu as fait preuve pour t'être approprié avec tant d'efficacité et de pertinence tes projets, sont autant de qualités qui souligneront toute la réussite que tu mérites. Merci pour avoir entretenu avec moi la mémoire de chansons à texte (*Les mots bleus*, Christophe et al. 1974 ; *Week-end à Rome*, E. Daho et al. 1984...) dont les messages profondément philosophiques demeurent incompris. Je me souviendrai également de notre complicité Aristo-aillurophile qui me donne aujourd'hui l'occasion d'ajouter un mot à mon champ lexical !

Betty, merci pour ta fraîcheur. Partager avec toi la fin de cette aventure m'a réellement permis de retrouver à travers toi l'enthousiasme de mes débuts. Toujours volontaire et réceptive, tu as pris le relais avec tout l'intérêt et toute l'attention que j'espérais ; je t'en remercie. Merci d'avoir joué le jeu de nos moments de dérision ; je les voulais preuve de l'affection que je te porte. Merci pour nos 4 mains expérimentaux, pour ta devise attentionnée « boire, manger, dormir », pour nos interprétations douteuses de *Christine and the Queens*, pour le soubassophone malgré toi.

Salwan, merci pour ta simplicité et ta profonde gentillesse. J'ai beaucoup apprécié nos longues et enrichissantes discussions testiculaires ou métaboliques. Merci d'avoir concurrencé avec ma paillasse dans la catégorie « *friche savamment maîtrisée* ». J'espère avoir la chance de recroiser un jour ta route. Je te souhaite sincèrement de belles choses pour le futur.

Emilie, merci pour ta logorrhée rassurante et ton rire généreux ; ils ont marqué d'une bien belle façon mon quotidien au laboratoire. Tes conseils m'ont été précieux dans cette dernière ligne droite. Merci.

Matthias et Alex, duo de choc, quelle joie de vous avoir rencontrés.

Matthias, au delà de l'incarnation du confort visuel que tu représentes, je me souviendrai du soutien sincère que tu m'as apporté en cette fin de thèse.

Alex, merci d'avoir relevé avec brio et humour le challenge de m'offrir une rééducation des zygomatiques quotidienne pendant la rédaction de ce manuscrit.

Cameron, Julie, Annabel, Emilie, Fanny, et Aurélien, merci de nous avoir ouvert la voie.

Anthony, Marjorie, Typhanie, Alexandre, Mickaël (Truc) et Houdda, je vous souhaite tout simplement le meilleur pour cette belle aventure. Profitez de la chance d'être ensemble pour affronter les déceptions et du *Jägermeister* pour toute autre occasion !

Angélique, merci pour ton investissement et ton aide efficace et toujours volontaire. Jean-Paul, Sheriff des temps modernes, merci pour tes conseils méticuleux, tes sursauts affectueusement provoqués au détour des couloirs, et le partage malgré toi de tes ondes radio. Christelle, merci pour ta disponibilité et ton écoute toujours attentive. Je suis enchantée d'avoir fait équipe avec vous !

Sandrine, Khirredine et Philippe, ce fût un plaisir de partager avec vous cette expérience. Merci d'avoir céder avec compréhension, soutien et efficacité à mes encombrants caprices animaliers !

A mes amis,

Coralie, quelle chance de t'avoir à mes côtés ! J'ai tellement appris de toi. Tu es quelqu'un de juste, d'une intégrité et d'une générosité rare en laquelle j'accorde aveuglément toute ma confiance. Merci d'avoir toujours été là ; de me connaître si bien. J'ai souvent redouté ces quelques lignes. Je n'aurai jamais les mots justes ; je sais que tu me le pardonneras. Merci de t'être confiée à moi. Ta discrétion fait de ces moments des instants rares ; je les sais mérités. Merci de m'avoir accordé ta confiance et ton amitié. Nous savons toutes deux que tu m'en as donné la preuve ultime un jour à l'animalerie... fidèle à ce que l'on en croit être la définition ! Merci pour le pineau salubre et mes appartements secondaires. Merci d'avoir eu la patience de me mater et d'avoir surpassé à cette occasion la palpable tentation dite du « *bébé congelé* ». Merci pour nos virées *Rust-iques* complices et quelque peu intéressées. Merci pour nos soirées les lèvres noircies par le vin. Merci pour tout cela et tellement plus encore ! Il m'est aujourd'hui difficile d'envisager mon quotidien loin de toi. J'ai confiance en nous pour que rien ne change pour autant. Merci de m'avoir permis de rencontrer ton tendre Mickaël.

Mickaël, merci d'avoir partagé vinyles, confessions, confidences, cafés au comptoir et bières en terrasse. Je suis sincèrement heureuse de t'avoir rencontré, toi et ton estomac complice. Je te souhaite le meilleur à base de pop'op'op'op' !

Rafik, au nom de notre amour vache je me suis trop souvent interdite de te révéler au combien notre amitié m'est précieuse. C'est aujourd'hui chose faite ; mais ne t'emballer pas, une fois n'est pas coutume ! Tu es quelqu'un dont l'intelligence transparait à travers nombre de qualités. Durant ces années, j'ai souvent jaloué ton esprit scientifique ; merci d'avoir eu l'humilité, la générosité et la patience de le partager. J'admire la persévérance dont tu fais preuve. J'envie le musicien que tu es. Merci pour ton humour fin et pourtant sans concession dont on sait que c'est une preuve d'affection que d'en faire les frais. Je me souviendrai de ta présence attentive et de ton soutien sincère lorsqu'ils m'ont été essentiels. Je te dois beaucoup.

Heidi, *Brillante* : ce qualificatif te correspond en tous points. *Brillante* de part la passion appliquée que tu portes à la recherche et à l'enseignement ; de part ta modestie, ta persévérance et ton courage lorsque l'on connaît ton parcours. Mais aussi, *Brillante* de part ton sourire inébranlable enraciné dans les esprits de ceux qui t'entourent. Merci pour ton amitié pure et bienveillante, ta présence fidèle au quotidien comme dans les grands moments, ta générosité, nos rires, tes Allô quoi dont j'ai tout appris, le Pastis à la saveur déraisonnable, les manucures sabbatiques. Je sais ton Gauthier t'être précieux. Merci de nous avoir laissé te l'emprunter pour nourrir et abreuver nos gosiers.

Marion, rares sont les amitiés qui demeurent malgré la distance. Nous le devons sans doute à ton esprit têtard qui s'applique souvent aux meilleures causes. Merci d'avoir toujours pris le soin de nous rassembler. Nous te devons notre photogénie en lutte contre le double menton mais aussi le sabotage volontaire de nos silhouettes entretenues par ta générosité culinaire. Merci pour ton impertinence vestimentaire assumée à laquelle j'ai souvent secrètement adhéré ! Je te promets de porter dignement la tradition du *Flea-market Kitchissime Award* au delà de nos frontières !

Ludovic, merci pour ton amitié honnête et sincère, et ton extrême générosité. Merci pour ta simplicité. Merci d'avoir ri à mes blagues lorsque leur humour était discutable. Merci pour avoir sabré les champagnes qui ont marqués les occasions qui me sont chères. Merci d'avoir entretenu la flamme d'un BBQ mémorable. Il y a des gens sur lesquels je sais pouvoir compter. Tu en fais partie.

Kevin : hérité du prénom d'origine gaélique Caoimhim, dérivé de l'adjectif caomh signifiant le "bien aimé". L'Etymologie pour les nuls a encore frappé ! Comme toujours, elle dit vrai ! Merci pour nos moments de complicité. Merci de m'avoir permis de rencontrer ta belle et douce Géraldine. L'enchantement du bouquet est entre de bonnes mains, c'est une évidence !

A vous, avec qui tout a commencé,

Charlotte, mon amie depuis tant d'années. Merci d'avoir suivi mon parcours avec autant d'intérêt et d'attention. Merci d'avoir eu la patience de partager cette aventure. Tu as su si bien comprendre la passion que je lui accordais mais aussi les angoisses qu'elle suscitait ; tes conseils et ton écoute ont permis souvent de m'en éloigner et de prendre le recul nécessaire pour repartir d'un bon pied. Nos instants au Sagnat resteront synonymes d'une apaisante inspiration d'air frais. Je suis tellement fière aujourd'hui de ce que nous avons chacune accompli. Je suis certaine que tu as encore plus d'un tour dans ton sac pour faire pâlir le mythe déchu de la belle Orlène !

Guillaume, mon Bro, et Marion, j'aurais tellement aimé pouvoir nous accorder plus de temps durant ces années. J'ai souvent pensé à vous. Merci d'être là depuis le début.

Pierre-Anthony, Madeleine, Vadim, Alban, Dédé, Loulou, Maxime, Emma, Finou, Rémi, Colin, Elsa, Maxime et Line, je suis ravie de vous avoir autour de nous. Merci pour nos dîners, randonnées, *famiente* et autres soirées. Les occasions se sont faites rares par ma faute et malgré moi. A chaque fois ce fût un réel plaisir. Merci d'avoir compris et de me l'avoir laissé.

A ma famille,

Maman, merci de m'avoir toujours permis de poursuivre mes projets. Je te dois de les avoir vécu pleinement, avec la sérénité essentielle à leur réussite ; une chance que je sais rare. Merci d'avoir cru en moi plus fort que quiconque. Te savoir fière m'a donné la confiance et la force d'aller au bout. Merci d'avoir forgé ce que je suis devenue ; je te dois tant de valeurs essentielles. Merci pour ton amour, ton réconfort, notre complicité et nos rires. Ce que j'ai toujours accompli, ce que je suis : c'est grâce à toi.

Alain, merci d'avoir toujours suivi avec attention et bienveillance mon parcours. J'ai appris de toi la patience, la précision et le goût de la perfection. Qu'il est bon de te savoir veiller sur nous.

Mamy, Papy, merci de m'avoir soutenue et suivie avec tant d'attention durant ces longues années. Papy, je me souviens encore de nos trajets depuis mes sorties de « colles » en première année ; Mamy, de tes *Tupperwares* soignés où rien ne manquait. Vous avez rendu les choses infiniment plus faciles. Merci d'avoir compris et accepté mes absences lorsque le travail les imposait. C'est sans l'ombre d'un doute que je peux me vanter d'avoir les grands-parents les plus formidables au monde ! Merci pour votre bienveillance et votre tendre complicité. J'ai beaucoup de chance de vous avoir auprès de moi.

Manon, ma Choupy, *Petite sœur*. Qu'il est bon de te savoir près de moi ! J'aurais tellement aimé nous accorder plus de temps. Merci pour notre complicité comme une évidence. Tu es devenue une jeune femme accomplie, intelligente, lumineuse et pleine d'esprit ! Je te sais aussi courageuse, tendre et sensible. Te voir épanouie, portée par des projets prometteurs, est un réel bonheur. Je suis si fière de toi ! Je garde en tête ta si belle formule : *Never without them*.

Bruno, je pense à toi chaque jour ; je t'imagine commenter et encourager mon quotidien. De là où tu es j'espère t'avoir rendu fier.

Mattéa, que tu as grandi ! Je souhaite plein de réussite à la jeune femme que tu es devenu. Je serai là pour veiller sur toi.

Antoine, les années à venir passeront trop vite ! Je te souhaite de faire les bons choix ; ceux qui te permettront de vivre à fond cette aventure tout en assurant la perspective qu'elle te mène à ce à quoi tu aspires.

Ma belle famille, Nathalie, Philippe, Quentin, Stéphanie, Eloïse, Coline, Gaëtan et Manou, quel bonheur de vous avoir autour de nous ! Merci de m'avoir accueillie avec tendresse, générosité et attention dans votre si douce famille ; je suis riche de la savoir à présent mienne. Merci de me permettre de le garder précieusement à mes côtés et de vivre ensemble cette folle aventure ; je considère chaque jour cette chance. Merci de nous comprendre.

Fabien,

L'occasion m'est donnée ici de te l'avouer : l'issue de cette aventure, je te la dois. Merci d'avoir pris la mesure de l'importance que j'attachais à te la voir vivre avec moi. Tu es arrivé en chemin. Ce n'était certainement pas le plus facile. Je n'osais pas imaginer recevoir tant de toi. Merci d'avoir tout partager sans concession, comme s'il s'agissait d'une évidence. Pourtant je devine au combien il t'a fallu faire preuve de patience ! Tu as su m'apporter équilibre, lucidité, apaisement et réconfort face à mes angoisses ; me rendre forte et confiante en te sachant fier ; me rassurer dans l'ambition folle de mes projets en te sachant à mes côtés. Merci d'avoir été là, d'être là et de m'avoir fait la belle promesse de l'être pour toujours.

Liste des communications

Une partie de ces travaux a été présenté aux congrès suivants :

Communications orales à des congrès ou conférence avec comité de lecture

Keystone, Epigenetic Programming and Inheritance, Boston - année 2014

« Paternal bile acids exposure: a dark messenger throughout generations »

2nd congrès ENOR, European Network for Oxysterol Research, Dijon - année 2012

« Bile acid...a molecular link between liver and testis functions »

Journée de l'Institut Fédératif de la Recherche 2011, Clermont-Ferrand - année 2011

« Impact d'un apport exogène d'acides biliaries sur la physiologie testiculaire »

- *Prix de la meilleure communication orale* -

**Allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche,
Clermont-Ferrand - année 2011**

Ecole doctorale des Sciences de la Vie, Sante, Agronomie, Environnement

Communications affichées

Keystone, Epigenetic Programming and Inheritance, Boston - année 2014

« Paternal bile acids exposure: a dark messenger throughout generations »

Martinot E., Lobaccaro JM.A., Volle D.H.

30ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Paris - année 2013

« Bile acids mediate hepatic catabolism of testosterone during cholestasis »

Baptissart M., Vega A., Houten S.M., Martinot E., Marceau G., De Haze A., Baron S., Schoonjans K., Lobaccaro JM.A., Volle D.H.

Dans le cadre de la formation Les Doctoriales, Les Karellis - année 2013

« Infertilité masculine : il y a de quoi se faire de la bile ! »

Baptissart M., Vega A., Houten S.M., Martinot E., Marceau G., De Haze A., Baron S., Schoonjans K., Lobaccaro JM.A., Volle D.H.

- *Prix de la meilleure communication orale* -

Journée de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand - année 2012

« Les acides biliaries participent aux effets délétères de la cholestase sur la fertilité masculine »

Baptissart M., Vega A., Houten S.M., Martinot E., Marceau G., De Haze A., Baron S., Schoonjans K., Lobaccaro JM.A., Volle D.H.

Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles publiés ou en cours de publications :

Article I

Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice.

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Pommier AJ, Houten SM, Marceau G, de Haze A, Baron S, Schoonjans K, Lobaccaro JM, Volle DH
Hepatology, 2014

Article II

Paternal exposure to bile acid induces transgenerational abnormalities of progenies.

Baptissart M, Martinot E, de Haze A, Arnaud P, Baron S, Thibault-Carpentier C, Schoonjans K, Caira F, Volle DH
En préparation

Article III

Bile acid exposure reveals Dax-1 as a new target gene of the Farnesol-X-Receptor alpha in the regulation of testicular steroidogenesis in pubertal mice.

Baptissart M, Martinot E, de Haze A, Vega A, Caira F, Schoonjans K, Baron S, Volle DH
En préparation

Les articles suivants sont présentés en annexe :

Annexe I

Bile acids: From digestion to cancers (review)

Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH
Biochimie, 2013

Annexe II

Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? (review)

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH
Cellular and Molecular Life Sciences, 2013

Annexe III

Is spermiogenesis the critical step for answering biomedical issues ? (review)

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Volle DH
Spermatogenesis, 2013

Annexe IV

Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP

Vega A, Baptissart M, Martinot E, Saru JP, Baron S, Schoonjans K, Volle DH
Expert Opinion, 2014

Annexe V

Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures (review)

Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro JMA, Volle DH
Frontiers in endocrinology, 2012

Annexe VI

Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted? (review)

Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH
Molecular and cellular Endocrinology, 2012

Annexe VII

Identification of the link between hypothalamo-pituitary axis 1 and the testicular orphan nuclear 2 receptor NR0B2 in male mice.

Vega A, Martinot E, Baptissart M, de Haze A, Saru JP, Baron S, Caira F, Shoonjans K, Lobaccaro JMA, Volle DH

Endocrinology, 2015

Résumé

Résumé

Chez l'homme, des données cliniques décrivent une association entre des pathologies hépatiques et des désordres de la fertilité masculine. Plusieurs modèles expérimentaux de cholestase ont permis de confirmer ce lien et de souligner un impact sur la physiologie testiculaire. De manière intéressante, une telle corrélation existe aussi bien à l'âge adulte que dans des modèles animaux en période pré-pubertaire. Pour autant, le lien moléculaire pouvant expliquer cette association physiopathologique n'a pas été exploré.

L'ensemble des hépatopathies a pour dénominateur commun une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires et ce dès les stades les plus précoces de la maladie. Dans ce contexte, l'hypothèse de l'impact délétère des acides biliaires sur la fonction reproductrice reste à définir.

Notre projet de recherche s'articule autour de l'analyse d'un modèle murin d'atteinte hépatique induite par un régime supplémenté en acide cholique. Nos résultats principaux montrent que : 1) lors d'une exposition pubertaire, l'activation supra-physiologique des signalisations $Fxr\alpha$ conduit à un défaut de maturation sexuelle associé à une altération de la fonction endocrine du testicule ; 2) dans un contexte d'exposition à l'âge adulte, l'activation excessive du récepteur membranaire $Tgr5$ par les acides biliaires est associée à une hypofertilité. Celle-ci s'accompagne d'une altération de la spermatogenèse consécutive à un détachement progressif de l'épithélium séminifère et à une apoptose spécifique des spermatides ; 3) enfin, nos conclusions démontrent pour la première fois l'impact transgénérationnel de l'exposition aux acides biliaires. Sur deux générations successives, les descendants des mâles adultes nourris par un régime supplémenté en acide cholique présentent des anomalies développementales et métaboliques. Dépendantes de l'action de $Tgr5$, ces dernières sont attribuées à des altérations de l'épigénome des spermatozoïdes issus des mâles exposés aux acides biliaires.

En conclusion, nos données démontrent que, dans des conditions cholestatiques, les acides biliaires altèrent les fonctions de reproduction notamment par leurs impacts sur les fonctions testiculaires. Au regard du nombre croissant de personnes souffrant de troubles hépatiques, ces effets délétères des acides biliaires pourraient contribuer à l'augmentation de l'incidence de l'infertilité masculine. Des molécules agonistes des signalisations $FXR\alpha$ et $TGR5$ sont aujourd'hui envisagées dans le cadre du traitement de pathologies courantes de notre société. Dans ce contexte, notre étude permettra d'alerter les instances sanitaires quant aux conséquences de l'accès à de tels traitements sur la fertilité et la santé des générations futures.

Mots clefs : Acides biliaires, $Fxr\alpha$, $Tgr5$, Physiologie testiculaire, Effets transgénérationnels

Abstract

Clinical data describe an association between liver diseases and disorders of male fertility. Several experimental models of cholestasis have confirmed this link and highlight an impact on testicular physiology. Interestingly, such correlation exists in adult as well as in during pre-pubertal animals. However, the molecular links have not been explored yet.

The increase of plasma bile acids levels is a common feature of liver diseases. In this context, the hypothesis of the deleterious impact of bile acids on reproductive function remains to be defined.

For that purpose, we used a mouse model of liver injury induced by a diet supplemented with cholic acid. Main results show that: 1) supra-physiological activation of Fxr α , during pubertal period, alters endocrine function of the testis and then sexual maturation. 2) during adult age excessive activation of membrane receptor TGR5 by bile acids leads to subfertility. This is associated with impaired spermatogenesis due to a detachment of the seminiferous epithelium and specific apoptosis of spermatids. 3) Finally, we show for the first time the transgenerational impact of bile acid exposure. Two generations of progenies from males exposed to bile acid-diet show developmental and metabolic abnormalities. These effects, mediated by TGR5, are correlated with alterations of the spermatozoa epigenome.

In conclusion, our data demonstrate that bile acids affect reproductive functions with impacts on testicular functions. In line with the increasing number of people with liver diseases, the deleterious effects of bile acids may contribute to the incidence of male infertility. Interestingly, agonists of FXR α and TGR5 are now considered in the treatment of several diseases. In this context, our study might alert health authorities regarding the potential consequences of these treatments on fertility and health futures generations.

Key words : Bile acids, Fxr α , Tgr5, Testis physiology, Transgenerational effects

Abréviations

A

Aal	spermatogonie A alignée
ABC	<i>Atp-binding cassette</i>
ABT1	<i>Activator of basal transcription 1</i>
ACC	<i>Acetyl-coa synthase</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
ALAT	<i>Alanine aminotransferase</i>
AMPc	<i>Adenosine monophosphate cyclique</i>
ApoC-II	<i>Apolipoprotéine C II</i>
Apr	spermatogonie A appariée
AR	<i>Androgen receptor</i>
ARE	<i>Androgen response element</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARP	<i>Actin related proteins</i>
As	<i>A Single</i>
ASAT	Aspartate Aminotransferase
ASBT	<i>Apical sodium-dependent bile acid cotransporter</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
AUDC	Acide ursodéoxycholique

B

BAAT	<i>Bile acid:amino acid transferase</i>
BACS	<i>Bile acid:coa synthase</i>
bFGFs	<i>basic Fibroblast growth factor</i>
BHT	Barrière hémato-testiculaire
BLIMP1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BPA	Bisphénol A
BrdT	<i>Bromodomain testis-specific protein</i>
BSEP	<i>Bile salt export pump</i>

C

CA	<i>Cholic acid</i>
CAF-1	<i>Chromatin assembly factor 1</i>
CAIS	<i>Complete androgen insensitivity syndrome</i>
CamK	<i>Calmodulline kinase</i>
CAR	<i>Constitutive androstane receptor</i>
CBP	Cirrhose biliaire primitive
CCK	Cholécystokinine
CDCA	<i>Chenodeoxycholic acid</i>
CpG	Cytosine-p-guanine
CRBP	<i>Cellular retinol binding protein</i>
CREB	<i>c-AMP response element-binding protein</i>
CREM	<i>c-AMP response element modulator</i>
CSP	Cholangite sclérosante primitive
Cx	Connexines
CYP	Cytochrome

D

DBD	<i>DNA binding domain</i>
DCA	<i>Deoxycholic acid</i>
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DES	Diethylstilbestrol
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DHT	Dihydroxytestostérone
Dio2	<i>Iodothyronine deiodinase 2</i>
DLK1	<i>Delta-like 1 homolog</i>
DMRs	<i>Differentially methylated regions</i>
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
DR	<i>Direct repeat</i>

E

E	jour Embryonnaire
E2	<i>Estradiol</i>
EC	<i>Efficient concentration</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELMO	<i>Engulfment and cell motility</i>
EPS	<i>Epidermal growth factor receptor kinase substrate</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
ES	<i>Ectoplasmic specialization</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste 2</i>

F

FABP	<i>Fatty acid binding protein</i>
FGFR4	<i>Fibroblast growth factor receptor 4</i>
FIV	<i>Fécondation in vitro</i>
FOXL2	<i>Forkhead box l2</i>
FOXO1	<i>Forkhead box protein o1</i>
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i>
FSHR	<i>Follicle-stimulating hormone receptor</i>
FXR α	<i>Farnesol-X-receptor alpha</i>

G

G6P	<i>Glucose-6-Phosphatase</i>
GDNF	<i>Glial-cell-line-derived neurotrophic factor</i>
GH	<i>Growth hormone</i>
GJA1	<i>Gap junction protein alpha 1</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i>
GLUT	<i>Glucose transporter</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GnRH-R	<i>Gonadotropin-releasing hormone receptor</i>
GPBAR	<i>G protein-coupled bile acid receptor</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
GPOR	<i>G protein-coupled estrogen receptor</i>
GPR1	<i>G protein-coupled receptor 1</i>
Gr	<i>Glucocorticoide receptor</i>
GTL2	<i>Gene trap locus 2</i>
γ -GT	<i>Gamma-Glutamyl-Transpeptidases</i>

H

HNF4 α	<i>Hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
Hrn	<i>Hepatic p450 reductase null mice</i>
HSPA2	<i>Heat shock proteins a2</i>
hyo-CA	<i>acide hyocholique</i>

I

IAP	<i>Intracisternal A-particle</i>
IBABP	<i>Ileal bile acid binding protein</i>
ICP	<i>Intrahepatic cholestasis of pregnancy</i>
ICR	<i>Imprinted control region</i>
ICSI	<i>Intra cytoplasmic sperm injection</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGF2R	<i>Insulin-like growth factor 2 receptor</i>
IL1	<i>Interleukine-1</i>
INF γ	<i>Interféron gamma</i>
Int	<i>spermatogonie Intermédiaire</i>
IP3	<i>Inositol-tri-phosphate</i>
IR1	<i>Inverted repeat 1</i>
IRM	<i>Imagerie par résonance magnétique</i>

J

JAM-C	<i>Junctional adhesion molecule</i>
JMJD	<i>JmjC-domain-containing histone demethylase</i>
JNK	<i>c-Jun nh(2)-terminal kinase</i>

K

KDM	<i>lysine (K)-specific demethylase</i>
KMT	<i>lysine (K)-specific methyltransferases</i>

L

LBD	<i>Ligand binding domain</i>
LCA	<i>Acide lithocholique</i>
LDH	<i>Lactate deshydrogenase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LHR	<i>Luteinizing hormone receptor</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LINE	<i>Long interspersed nuclear element</i>
LKB1	<i>Liver kinase b1</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LRH1	<i>Liver receptor homolog 1</i>
LXR α	<i>Liver X receptor alpha</i>

M

MAFB	<i>v-Maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCTs	<i>Monocarboxylate transporters</i>
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MRP	<i>Multidrug resistance protein</i>
muri-CA	<i>acide muricholique</i>
MYBP	<i>Myosin-binding protein</i>

N

NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NCOR	<i>Nuclear corepressor</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor-kappa b</i>
NTCP	<i>Na⁺-dependent taurocholate cotransport peptide</i>

O

OATP	<i>Organic anion transporter</i>
OATS	<i>Oligoasthénotératospermies</i>
OMS	<i>Organisation mondiale de la santé</i>
OST	<i>Organic solute transporter</i>

P

PAIS	<i>Partial androgen insensitivity syndrome</i>
PAL	<i>Phosphatase alcaline</i>
PAR	<i>Poly ADP ribose</i>
PARG	<i>Poly ADP ribose glycohydrolase</i>
PARP	<i>Poly ADP ribose polymérase</i>
PEPCK	<i>Phosphoenolpyruvate-carboxykinase</i>
PFIC2	<i>Progressive familial intrahepatic cholestasis</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 alpha</i>
PGCs	<i>Primordial germ cells</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	<i>Protéine Kinase A</i>
POLG	<i>DNA polymerase gamma</i>
PRDM	<i>PR domain-containing protein</i>
PRM	<i>Protamine</i>

PtdSer	Phosphatidyl-sérine
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>

R

RAR α	<i>Retinoic acide receptor alpha</i>
RASSF1A	<i>Ras association domain family 1 isoform a</i>
RHOX5	<i>Reproductive homeobox X-linked</i>
RIP14	<i>RXR-interacting-protein-14</i>
RNF	<i>Ring finger protein</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RXR α	<i>Retinoid x receptor-alpha</i>

S

Scc	<i>Side-chain clivage</i>
SCD1	<i>Stearoyl coenzyme a desaturase 1</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF	<i>Stromal cell-derived factor</i>
SHBG	<i>Sex hormone binding-globuline</i>
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
SINE	<i>Short interspersed elements</i>
SMAD	<i>Sma and mad related proteins</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SNRPN	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide n</i>
SOX	<i>Sry-related hmg box</i>
SRC1	<i>Steroid receptor coactivator 1</i>
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element binding protein-1c</i>
SRY	<i>Sex determination region on y chromosome</i>
SSCs	<i>Spermatogonial stem cells</i>
StAR	<i>Steroidogenesis activator protein</i>
STC-1	<i>Stanniocalcin-1</i>
STRA8	<i>Stimulate by retinoid 8</i>
SULT	<i>Sulfotransferase</i>

T

T3	<i>Tri-iodothyronine</i>
TBC	<i>Complexe tubulobulbaire</i>
TCF	<i>Transcription Factor</i>
TeBG	<i>Testosterone binding-globuline</i>
TGF- α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloprotease</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNP	<i>Transition protein</i>
TOP2B	<i>Topoisomérase-2-beta</i>
TPMM	<i>Transition de perméabilité des membranes mitochondriales</i>

U

UGT	<i>UDP-glucuronyltransferase</i>
-----	----------------------------------

V

VDR	<i>Vitamin D receptor</i>
VLDLs	<i>Very low density lipoprotein</i>

Z

ZO	<i>Zona occludens</i>
----	-----------------------

Sommaire

Introduction bibliographique.....	1
Avant propos	1
Partie 1. Physiologie du testicule	3
A. Le tube séminifère : siège de la spermatogenèse	3
1. La lignée germinale	4
1.1. Détermination embryonnaire de la lignée germinale chez la souris	4
1.1.1. La gonade indifférenciée : « structure d'accueil » des PGCs	4
1.1.2. Les PGCs : origine et différenciation	5
1.2. La première vague	6
1.3. Les 3 phases de la spermatogenèse	7
1.3.1. La phase proliférative	7
1.3.2. La phase méiotique	8
1.3.3. La spermiogenèse	9
a) Elimination du corps résiduel	10
b) Développement du flagelle	10
c) Développement de l'acrosome	10
d) Compaction de la chromatine	10
1.3.4. Spermiation et maturation post-testiculaire	11
1.4. Epigénétique et spermatogenèse	11
1.4.1. Mise en place de l'épigénome des cellules germinales	12
a) Méthylation de l'ADN	12
b) Modifications post-traductionnelles des histones	17
c) La transition histone-protamine	18
d) Les histones et le spermatozoïde	21
2. La cellule de Sertoli	23
2.1. Fonctions	23
2.1.1. Rôle architectural	23
a) Géographie des jonctions intercellulaires de l'épithélium séminifère	24
b) Dynamique et régulation des jonctions épithéliales	27
c) Exemple du dialogue autocrine laminine-intégrine	28
d) Interactions structurales et fonctionnelles des jonctions épithéliales	29
2.1.2. La Sertoli : cellule sécrétrice	30
2.1.3. Activité de phagocytose	31
2.2. Contrôle des fonctions sertoliennes	32
2.2.1. Contrôle endocrine	32
a) La Fsh	32
b) Autres hormones	33
2.2.2. Contrôle paracrine	34
B. L'espace interstitiel	36
1. Biosynthèse des androgènes testiculaires chez la souris	36
2. Régulation de la synthèse de testostérone	37
2.1. Contrôle par l'axe neuro-endocrinien hypothalamo-hypophysaire	37
2.2. Régulation de la stéroïdogenèse par les récepteurs nucléaires : exemple des interactions entre Lrh1/Sf1 et Shp/Dax-1	38

2.3. Les androgènes: biodisponibilité et mode d'action	39
3. Androgènes et fonctions testiculaires.....	40
3.1. Testostérone et stéroïdogenèse de la cellule de Leydig.....	41
3.2. Testostérone et fonctions sertoliennes	42
4. Les oestrogènes : métabolites actifs de la testostérone	43
4.1. Oestrogènes et fonction Leydigienne	45
4.2. Oestrogènes et balance prolifération / apoptose de la lignée germinale.....	46
Partie 2. Les acides biliaires	47
A. Biosynthèse	47
1. Synthèse des acides biliaires primaires	47
1.1. Initiation : voie classique et alterne	47
1.2. Conjugaison	49
2. Synthèse des acides biliaires secondaires	50
3. Cycle entéro hépatique	50
B. Les acides biliaires, molécules de signalisation cellulaire	51
1. Le récepteur nucléaire des acides biliaires : Fxr α	51
1.1. Généralités	51
1.2. Rôles physiologiques	53
1.2.1. Fxr α et acides biliaires	53
1.2.2. Fxr α et triglycérides.....	54
1.2.3. Fxr α et glucides	55
1.2.4. Fxr α et propriété anti-inflammatoire	56
1.2.5. Fxr α et hormones stéroïdiennes.....	56
a) Fxr α et glucocorticoïdes	56
b) Fxr α et hormones sexuelles	57
2. Le récepteur membranaire des acides biliaires : Tgr5	58
2.1. Généralités	58
2.2. Rôle physiologique	60
2.2.1. Tgr5 et acides biliaires	60
2.2.2. Tgr5 et dépense énergétique	61
2.2.3. Tgr5 et glucides	62
2.2.4. Tgr5 immunité et inflammation	62
C. Acides biliaires et physiopathologie	63
1. Les acides biliaires molécules détergentes.....	63
2. Acides biliaires et cancer	64
2.1. Catabolisme des acides biliaires	65
2.1.1. Phase I : les cytochromes	65
2.1.2. Phase II : la conjugaison	65
3. La cholestase : pathologie associée aux acides biliaires	66

3.1. Les différentes cholestases	67
3.1.1. Cholestases hépatocytaires : du trouble hépatique à la cholestase	67
a) Pathologies hépatiques : épidémiologie	67
b) Pathologies hépatiques : étiologies	67
c) Du trouble hépatique à la cholestase	68
3.1.2. Cholestases obstructives	68
a) Cholestases obstructive intra hépatiques.....	68
b) Cholestases obstructive extra-hépatiques.....	69
3.1.3. Cholestase gravidique	69
3.1.4. Cholestase néonatale	70
3.2. Signes cliniques de la cholestase	71
3.3. Les acides biliaires : premier marqueur de la pathologie	72
3.4. Prise en charge et traitements	73
Partie 3. Présentation du projet de recherche	75
<u>Résultats</u>	78
Article I	79
Discussion et perspectives, Article I	80
Article II	87
Discussion et perspectives, Article II	88
Article III.....	100
Discussion et perspectives, Article III	101
<u>Discussion et perspectives générales</u>	105
<u>Annexes</u>	117

Introduction bibliographique

Paramètre mesuré	Norme (normozoospermie)	Pathologie associée
Volume de l'éjaculat	2 - 6 mL	< 2mL : hypospermie > 6mL : hyperspermie 0 : aspermie / anéjaculation
pH de l'éjaculat	7,2 - 8	-
Numération des spermatozoïdes	40 M/éjaculat ou 20 M/mL	10 - 20 M/mL : oligozoospermie modérée 5 -10 M/mL : oligozoospermie importante 1 - 5 M/mL : oligozoospermie sévère quelques spz : cryptozoospermie 0 : azoospermie
Mobilité progressive	> 50%	< 50% : asthénozoospermie 0 : akinétospermie
Vitalité	> 50%	< 50% : nécrozoospermie
Morphologie	30% de formes typiques (classification de David) ou > 15% (classification de Kruger)	< 30% ou 15% : tératozoospermie
Leucocytes	< 1 M	> 1mL : leucospermie

Figure 1. Normes des spermogrammes.

La réalisation d'un spermogramme est systématique dans le cadre de consultations pour infertilité. Ce protocole prend en compte des caractères quantitatifs et qualitatifs du sperme : volume de l'éjaculat, pH, numération spermatique, mobilité et vitalité des spermatozoïdes, morphologie et présence de cellules rondes. En cas d'anomalies lors du premier échantillonnage, un deuxième examen est nécessaire. Il devra être réalisé à au moins un mois d'intervalle (idéalement à plus de 3 mois). *Selon Pratices Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2012.*

Introduction bibliographique

Avant propos

Les troubles de la fertilité sont en constante augmentation et concernent aujourd'hui près de 15% des couples à l'échelle mondiale (Lee and Foo, 2014). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), un couple est considéré comme hypofertile ou stérile s'il présente l'incapacité d'obtenir une grossesse après douze mois de rapports réguliers non protégés. Dans près de la moitié des cas, un facteur masculin contribue à l'infertilité du couple et dans 20%, il en est la seule cause (Lee and Foo, 2014). Les principales origines physiopathologiques de l'infertilité masculine peuvent être réparties de manière schématique en deux catégories.

Les anomalies d'origine excrétoire qualifient le défaut d'acheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles. Elles représenteraient 40% des cas d'infertilité (Slama et al., 2012). Ces dernières peuvent être constitutionnelles (anomalie congénitale, défaut de développement) ou acquises à la suite d'infections (orchi-épididymite, prostatite). Les troubles d'origine sécrétoire représentent quant à eux 60% des infertilités et décrivent l'altération de la production des spermatozoïdes (Slama et al., 2012). Parfois liés à un trouble central (défaut de libération des gonadotrophines LH/FSH ; *Luteinizing hormone/Follicle-stimulating hormone*), ils sont dans la grande majorité des cas la conséquence d'atteintes fonctionnelles du testicule. Ces dernières sont en constante augmentation ces dernières décennies à l'image d'autres atteintes testiculaires telles que le cancer (Mannuel et al., 2011) ou les anomalies de développement comme les cryptorchidies (Robin et al., 2010). Ces pathologies, regroupées sous le terme de «syndrome de dysgénésie testiculaire» (Wohlfahrt-Veje et al., 2009) mettent en cause de multiples facteurs : génétiques, environnementaux (Hauser and Sokol, 2008, O'Flynn O'Brien et al., 2010) et comportementaux (Elshal et al., 2009, Setarehbadi et al., 2012). Cependant, pour la majorité, le mode d'action par lequel ils interviennent dans le développement de la pathologie reste peu connu et près de 30% des cas d'infertilité demeure idiopathiques (Jungwirth et al., 2012).

Le diagnostic de l'infertilité masculine est basé en première intention sur une évaluation basique des caractères quantitatifs et qualitatifs du sperme, ou spermogramme (Figure 1) (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2012). Les principaux paramètres considérés sont le volume de l'éjaculat, son pH ainsi que la concentration, la mobilité, la vitalité et la morphologie des spermatozoïdes. Les pathologies de type asthénozoospermies, tératozoospermies ou nécrozoospermies désignent des altérations qualitatives des spermatozoïdes. Elles peuvent être couplées (OATS, oligoasthénotératospermies) ou non à une anomalie quantitative classifiée sous les termes d'azoospermie, cryptozoospermie ou oligozoospermie. Si cet examen est normal, il n'est pas

nécessaire de le répéter. En revanche, en cas d'anomalies constatées, il devra être confirmé lors d'un nouvel échantillonnage à au moins un mois d'intervalle et idéalement trois mois après le premier prélèvement (durée supérieure à un cycle de gamétogenèse chez l'homme) (Cao et al., 2011). Un spermogramme affecté pourra être complété par l'analyse de paramètres sériques endocriniens. Les taux de LH et de testostérone seront informatifs quant à la présence de troubles d'origine endocrinienne (hypogonadisme primaire ou secondaire). Des valeurs normales de FSH ou d'Inhibine B plaident en faveur d'une spermatogenèse fonctionnelle ; le diagnostic de l'infertilité s'oriente alors vers une azoospermie d'origine excrétoire. Cependant, chez 29% des hommes stériles, des taux de FSH normaux se sont révélés être associés à un défaut de spermatogenèse (Weber et al., 2005).

Les premières mesures diagnostiques de l'infertilité demeurent donc peu informatives quant à la détermination de son étiologie. Il est alors difficile d'orienter la prise en charge du patient. L'insémination intra-utérine s'adresse à des hommes présentant des spermatozoïdes (OATS) (Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, 2012). Le recours à la fécondation *in vitro* (FIV), voire à l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI, *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*), a lieu si les paramètres spermatiques sont très altérés. Les spermatozoïdes seront obtenus directement à partir de l'éjaculat lorsque cela est possible. Le recours aux prélèvements épидидymaires ou déférentiels est indiqué dans le cadre de pathologies obstructives. Le prélèvement de spermatozoïdes testiculaires est nécessaire lors d'azoospermies de type sécrétoire. La détermination de la cause de l'azoospermie est donc essentielle pour engager une prise en charge adaptée.

A la difficulté du diagnostic de l'infertilité s'ajoute le fait qu'il est aujourd'hui difficile d'anticiper les chances de réussite lors d'un protocole de procréation médicalement assistée (Matzuk and Lamb, 2008). Ceci est lié au rendement intrinsèque des techniques de FIV ou d'ICSI auquel s'ajoute des critères de sélection du spermatozoïde restrictifs et peu fiables ; selon l'OMS, un spermatozoïde à la maturation idéale doit avoir une tête ovalaire, d'une longueur de 4 à 5 microns et d'une largeur de 2,5 à 3,5 microns.

Ce constat soulève plusieurs enjeux pour l'avenir. Celui d'identifier les facteurs pouvant expliquer l'origine d'infertilités masculines restée à ce jour idiopathique ; celui de développer de nouveaux outils diagnostiques de l'infertilité facilitant le choix d'une prise en charge adaptée des patients ; et enfin celui de définir des marqueurs prédictifs de la réussite des protocoles de procréation médicalement assistée.

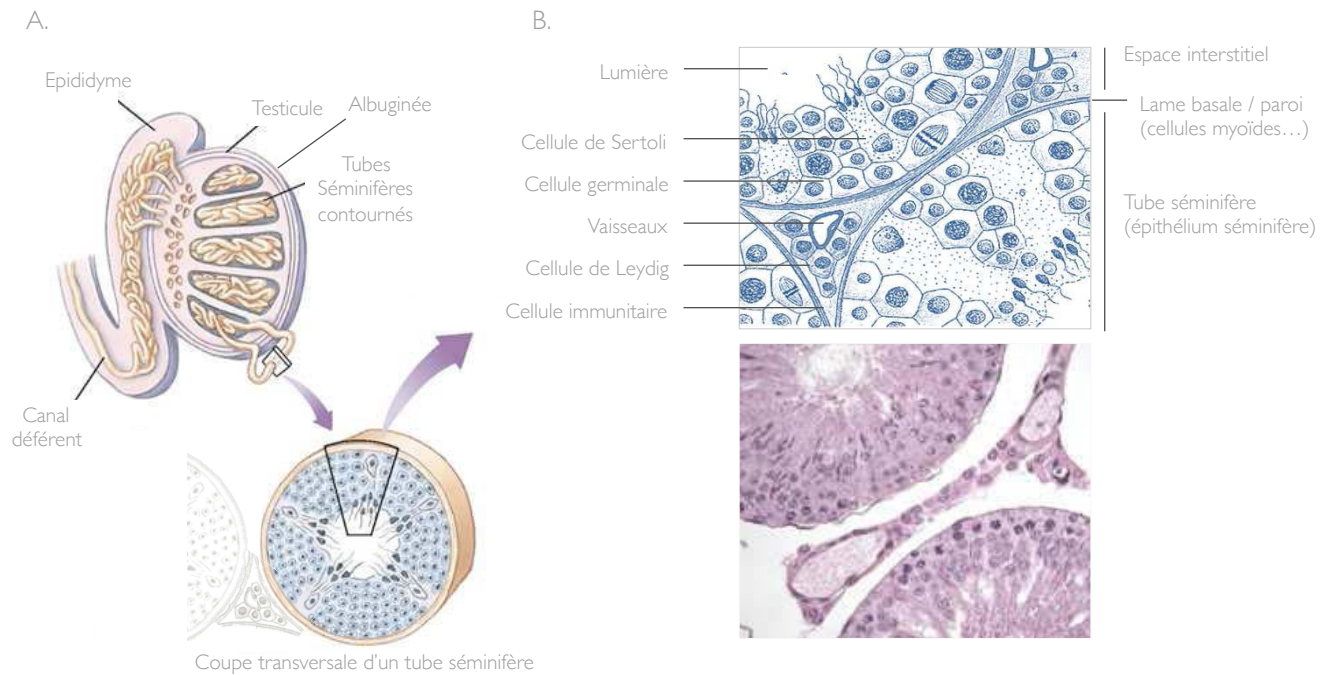


Figure 2. Anatomie et histologie du testicule.

A, Représentation schématique de la structure interne du testicule. Le testicule est composé de plusieurs lobules constitués d'un réseau dense de tubes séminifères séparés par l'espace interstitiel. *Modifié d'après De Boeck University*. **B**, Schématisation de l'histologie testiculaire. L'épithélium séminifère est composé de cellules de Sertoli et de la lignée germinale. L'espace interstitiel contient vaisseaux, cellules immunitaires et cellules de Leydig. *Modifié d'après Pr. George Dolisi*.

Partie 1. Physiologie du testicule

Le testicule est une glande paire et symétrique de l'appareil génital mâle située à la partie antérieure du périnée de part et d'autre du pénis. Appendus au cordon spermatique, les testicules sont logés dans une structure extra abdominale : le scrotum. Cette localisation anatomique permet leur maintien à une température favorable à la spermatogenèse de 4 à 7°C inférieure à celle du corps (Zorgniotti and Sealton, 1988).

Chaque testicule forme une masse ovoïde unique entourée d'une capsule conjonctive, l'albuginée (Figure 2). Composée de fibres de collagène et de cellules musculaires lisses, cette dernière s'enfonce dans le testicule pour constituer des cloisons, ou septa, qui définissent environ 300 lobules testiculaires. Chacun d'eux comportent 1 à 4 tubes séminifères séparés les uns des autres par un tissu conjonctif lâche aussi appelé espace interstitiel.

C'est autour de ces deux compartiments histologiques (tube séminifère et espace interstitiel) et de la spécificité des types cellulaires qui les composent que s'articulent, chez l'adulte, les deux fonctions majeures du testicule. Ainsi, la fonction dite endocrine est portée par les cellules de Leydig qui assurent, au sein de l'espace interstitiel, la synthèse des stéroïdes testiculaires (essentiellement testostérone et oestrogènes) ; la seconde, exocrine, s'articule autour des cellules de Sertoli qui assurent au sein des tubes séminifères le soutien structural et nutritif nécessaire à la différenciation des cellules germinales et à la production des gamètes mâles, les spermatozoïdes.

Bien que présentés comme indépendants sur le plan histologique, ces compartiments et les types cellulaires qui les constituent sont étroitement liés sur le plan fonctionnel. Il existe en effet un dialogue étroit entre les cellules de Leydig, les cellules de Sertoli et les cellules germinales faisant intervenir de multiples acteurs endocriniens, paracrines, autocrines et juxtacrines.

A. Le tube séminifère : siège de la spermatogenèse

La spermatogenèse est définie comme le processus physiologique par lequel les cellules germinales diploïdes, les spermatogonies, se différencient en cellules haploïdes hautement spécialisées, les spermatozoïdes.

Lors de la fécondation, ovule et spermatozoïde apportent le bagage génétique nécessaire au développement d'un nouvel individu qui contribuera à son tour à la transmission de ce patrimoine aux générations futures. Du bon déroulement de la spermatogenèse va ainsi dépendre la production de spermatozoïdes fonctionnels capables de transmettre une information génétique dont l'intégrité doit

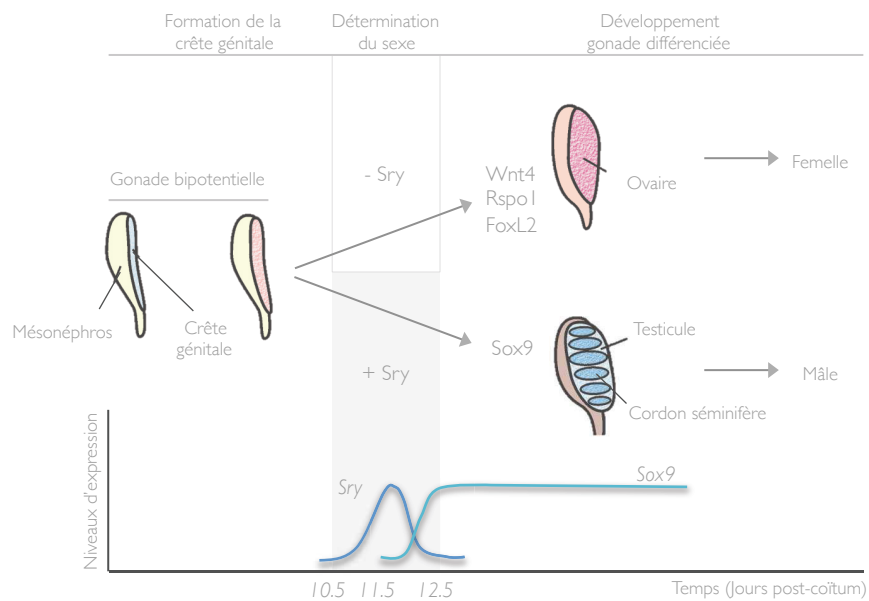


Figure 3. Schéma récapitulatif de la détermination gonadique chez la souris.

La gonade primitive se forme au cours du premier tiers de la gestation à partir de l'épaississement de l'épithélium coelomique. Elle possède alors un caractère bipotentiel. L'expression du gène *Sry* débute à 10,5 jours post-coïtum dans les cellules somatiques de la gonade mâle et atteint son maximum à 11,5 jpc puis s'éteint à 12,5 jpc. *Sry* induit l'expression du gène *Sox9* qui initie l'entrée en différenciation des cellules de Sertoli. Celles-ci s'organiseront alors en cordon séminifère. Plusieurs boucles de régulation sont activées afin de maintenir l'expression de *Sox9* à un niveau élevé. A son tour *Sox9* permettra l'expression de plusieurs gènes spécifiques au mâle tel que l'*Amh*. Dans la gonade femelle, en absence du gène *Sry*, les gènes *Wnt4*, *Rspo1* et *FoxL2* sont exprimés et induisent le développement ovarien. Modifié d'après Kashimada et Koopman, 2010.

Sry, Sry-determination Region on Y chromosome ; Jpc, jour post coïtum ; *Sox9*, Sry related HMG box 9 ; *Amh*, Anti-Müllérienne Hormone ; *Wnt4*, wingless-type MMTV integration site family, member 4 ; *Rspo1*, R-spondin 1 ; *FoxL2*, Forkhead box protein L2.

être impérativement maintenue afin d'assurer l'obtention d'une descendance saine garantissant la continuité de l'espèce.

Chez les mammifères, la spermatogenèse a lieu au sein du tube séminifère. Elle débute au moment de la puberté et sera maintenue constante durant toute la vie de l'individu. Les tubes séminifères contiennent les cellules germinales en différenciation ainsi que des cellules somatiques, les cellules de Sertoli. Leur association forme un épithélium stratifié, l'épithélium séminifère, dont le soutien est assuré par une lame basale et une paroi formée de fibres de collagène, de fibroblastes et de cellules myoïdes. Ces dernières possèdent une activité contractile participant à la propulsion des spermatozoïdes non mobiles vers les voies excrétoires.

1. La lignée germinale

1.1. Détermination embryonnaire de la lignée germinale chez la souris

Chez les souris, l'établissement de la lignée germinale a lieu dès le stade embryonnaire. Il s'agit d'un phénomène initialement indépendant de l'établissement des ébauches gonadiques. Les cellules somatiques de la gonade mâle se différencient à partir de la crête génitale. Elles constitueront la structure d'accueil des cellules germinales primordiales (PGCs, *Primordial Germ Cells*) qui trouvent leur origine dans les tissus extra-embryonnaires.

1.1.1. La gonade indifférenciée : « structure d'accueil » des PGCs

Les cellules somatiques du testicule ou de l'ovaire sont issues de la différenciation de la gonade primitive ou *primordium* gonadique. Chez la souris, cette ébauche embryonnaire se forme au cours du premier tiers de la gestation (E9.5 à E10 ; E, jour Embryonnaire) à partir de l'épaississement de l'épithélium cœlomique, aussi appelé crête génitale.

C'est sous l'influence de l'expression du gène *Sry* (*Sex determination region on Y chromosome*), gène majeur de la détermination testiculaire porté par le chromosome Y, que le primordium engage sa différenciation mâle (Figure 3) (Berta et al., 1990, Ross and Capel, 2005). A E11.5, l'expression du gène *Sry* dans les cellules de l'épithélium cœlomique est maximale puis s'éteint (Koopman et al., 1990). Cette expression transitoire induit l'expression du gène *Sox9* (*Sry-related HMG box 9*), facteur de transcription dont les niveaux demeureront élevés afin d'assurer le maintien du phénotype sexuel mâle (Hacker et al., 1995, Kent et al., 1996). Le facteur *Sox9* initie l'entrée en différenciation des précurseurs des cellules de Sertoli (Sekido et al., 2004). Encore immatures, ces dernières s'associent les unes aux autres et s'organisent en cordons séminifères qui engloberont peu à peu les PGCs pour former l'épithélium séminifère.

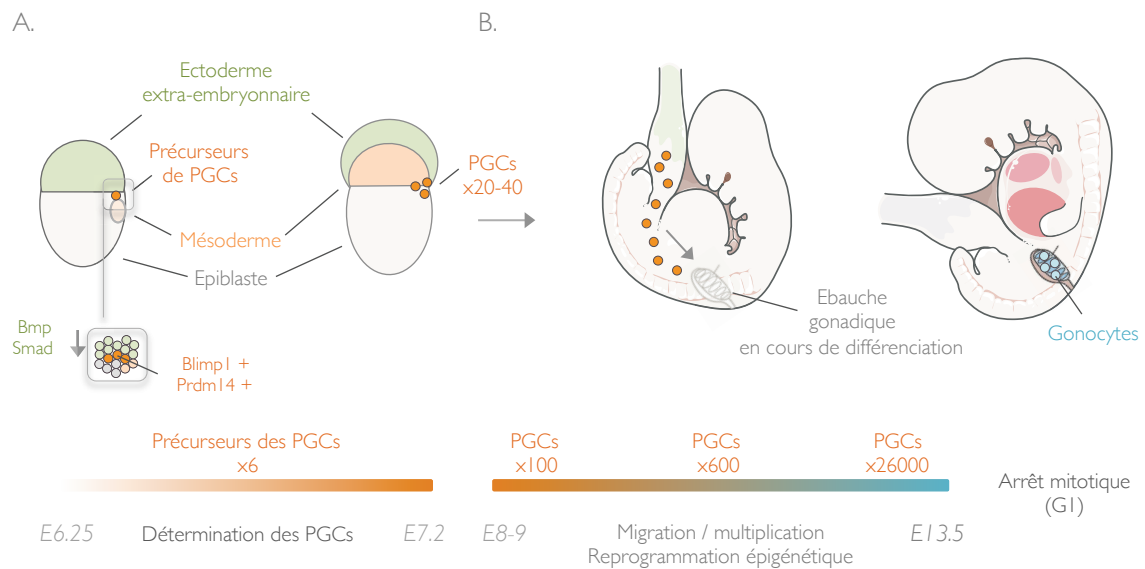


Figure 4. Dynamique de la détermination de la lignée germinale chez la souris.

A, Les précurseurs des PGCs voient le jour à partir de l'épiblaste à 6.25 jours embryonnaires (E6.25). Ce premier engagement dans la différenciation est sous l'influence de facteurs paracrines issus de l'ectoderme adjacent (Bmp, Smad). Les cellules progénitrices des PGCs sont alors au nombre de 6 exprimant les marqueurs *Blimp1* et *Prdm14*. **B**, Les PGCs sont déterminées à E7.2. Elles engagent alors leur migration jusqu'aux ébauches gonadiques qu'elles colonisent aux alentours de E10.5. Tout au long de leur migration les PGCs s'amplifient par mitoses successives puis se différencient au cœur des cordons séminifères en gonocytes (E13.5). Ces derniers seront maintenus en quiescence (phase G1) jusqu'au 5^{ème} jour après la naissance.

E, jour embryonnaire ; PGCs, *Primordial Germ Cells* ; Bmp, *Bone Morphogenetic Proteins* ; Smad, *Sma and Mad related proteins* ; Blimp1, *B Lymphocyte-induced maturation Protein-1* ; Prdm14, *PR DoMain-containing protein-14*

La différenciation des cellules de Sertoli est le premier évènement de l'organogenèse testiculaire. Les cordons séminifères primitifs se trouvent séparés les uns des autres par le mésenchyme. Celui-ci, au contact de l'épithélium coelomique se différenciera pour former l'albuginée (Ross and Capel, 2005). Ce n'est qu'au 13^{ème} jour embryonnaire qu'entre les cordons certaines cellules du mésenchyme se différencient en cellules de Leydig fœtales exprimant les enzymes stéroïdogènes (Greco and Payne, 1994).

1.1.2. Les PGCs : origine et différenciation

Les PGCs, précurseurs de la lignée germinale, sont issues de la différenciation de cellules progénitrices sélectionnées initialement à E6.25 à partir de l'épiblaste (Figure 4). Cette première étape de détermination cellulaire est sous l'influence de signaux paracrines sécrétés par l'ectoderme extra-embryonnaire (ex : Bmp-2/-4/-8b, *Bone morphogenetic proteins*, ; Smad-1/-5, *Sma and mad related proteins*) (Ewen & Koopman 2009).

Les cellules progénitrices des PGCs sont initialement en nombre réduit (6 cellules). Leur présence est caractérisée par l'expression des facteurs de transcription Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) et Prdm14 (*PR domain-containing protein-14*) à l'origine de la reprogrammation du profil transcriptionnel de leur génome. Dès lors les cellules progénitrices sont engagées dans le processus de différenciation et acquièrent peu à peu les caractéristiques propres aux PGCs (Ohinata et al., 2005, Yamaji et al., 2008).

Les PGCs sont clairement identifiées à 7,2 jours de développement dans les tissus extra-embryonnaires, à la base du sac vitellin. Leur nombre est alors de 20 à 40 cellules. Entre les 8 et 9^{ème} jours, du fait de mouvements morphogénétiques, les PGCs sont intégrées de manière passive à l'endoderme de la paroi intestinale. De là, elles vont migrer activement pour quitter l'intestin et rejoindre les ébauches gonadiques où elles participeront, en association avec les cellules de Sertoli immatures, à la formation de l'épithélium des cordons séminifères. La migration des PGCs dans la gonade est en partie contrôlée par les cellules somatiques du primordium gonadique par l'intermédiaire de facteurs de croissance (ex. Scf, *Stem cell factor* ; Lif, *Leukemia inhibitory factor* ; bFgf, *basic Fibroblast growth factor* ; Sdf1, *Stromal cell-derived factor 1*) ou encore de constituants de la matrice extracellulaire (ex. Collagènes type I/III/IV, Fibronectine, Laminine) (Wylie 1999, Stebler et al. 2004, Gu et al. 2009, Ewen & Koopman 2009).

Tout au long de leur migration, les PGCs se multiplient (100 PGCs à E8.5 ; 600 à E10.5 et 26000 à E13.5) puis se différencient au cœur des cordons séminifères en gonocytes (Nagano et al., 2000, Vergouwen et al., 1991) qui vont à leur tour s'amplifier par mitoses successives. Lors de cette

étape, on assiste à un remodelage global de l'épigénome des PGCs : la majeure partie des méthylations de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) est retirée ; cette reprogrammation est également associée à des modulations importantes du code histone.

A E13.5, les gonocytes entrent en quiescence et restent bloqués en phase G1 jusqu'à la naissance où ils achèveront la mitose initiée au stade embryonnaire (Western et al., 2008). Au 5^{ème} jour après la naissance, les gonocytes ont rejoint la membrane basale faisant naître la lumière des tubes séminifères. Ils commencent alors à se différencier en spermatogonies souches de type A.

1.2. La première vague

Au moment de la mise en place des fonctions testiculaires (7-8 jours *post-partum* chez la souris ; puberté chez l'homme), les cellules de Sertoli encore immatures perdent leur aptitude mitotique et acquièrent leur morphologie définitive au contact des spermatogonies (Clermont and Perey, 1957, Jégou, 1992). Le contexte endocrinien change. L'augmentation de la pulsativité de la gonadolibérine GnRh (*Gonadotropin-releasing hormone*) et de la sécrétion des gonadotrophines Lh/Fsh par l'axe hypothalamo-hypophysaire, sont responsables d'un nouveau pic hyper sécrétoire de testostérone (O'Shaughnessy et al., 2009). Parallèlement, la transcription du récepteur des androgènes Ar (*Androgen receptor*) par les cellules de Sertoli est initiée (Rey et al., 2009). Ces dernières vont alors acquérir la maturité fonctionnelle nécessaire au soutien de la spermatogenèse (mise en place des jonctions intercellulaires, production de Transferrine, Interleukine-1-alpha) (O'Shaughnessy et al., 2007)(Johnston et al., 2004, Denolet et al., 2006). Les spermatogonies peuvent alors entrer en différenciation : la première vague de spermatogenèse est initiée.

L'entrée en méiose de la lignée germinale est également dépendante de l'action des rétinoïdes. Durant la vie fœtale, les niveaux d'acide rétinoïque intra-testiculaires sont limités sous l'action catabolique de l'enzyme Cyp26b1 (Bowles et al., 2006, Koubova et al., 2006). A la puberté, l'expression de Cyp26b1 est réprimée, les rétinoïdes s'accumulent et activent le récepteur nucléaire Rar α (*Retinoic acid receptor alpha*) pour induire l'expression, par les cellules germinales, de Stra8 (*Stimulate by retinoid 8*), acteur indispensable à l'initiation et à la progression de la phase méiotique (Oulad-Abdelghani et al., 1996). Le récepteur nucléaire orphelin Shp (*Small heterodimer partner*) est impliqué dans le contrôle de l'équilibre entre les concentrations de rétinoïdes et l'activité de Rar α sur le promoteur de Stra8. Les souris invalidées pour le gène codant Shp présentent une entrée en méiose précoce de la lignée germinale associée à des niveaux élevés de transcrits Stra8 (Volle et al., 2007). Parallèlement, l'activation de Rar α au sein des cellules de Sertoli permet l'expression de MafB (*V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B*), facteur paracrine qui serait impliqué dans l'engagement en différenciation de la lignée germinale (Raverdeau et al., 2012). D'autre part, l'acide

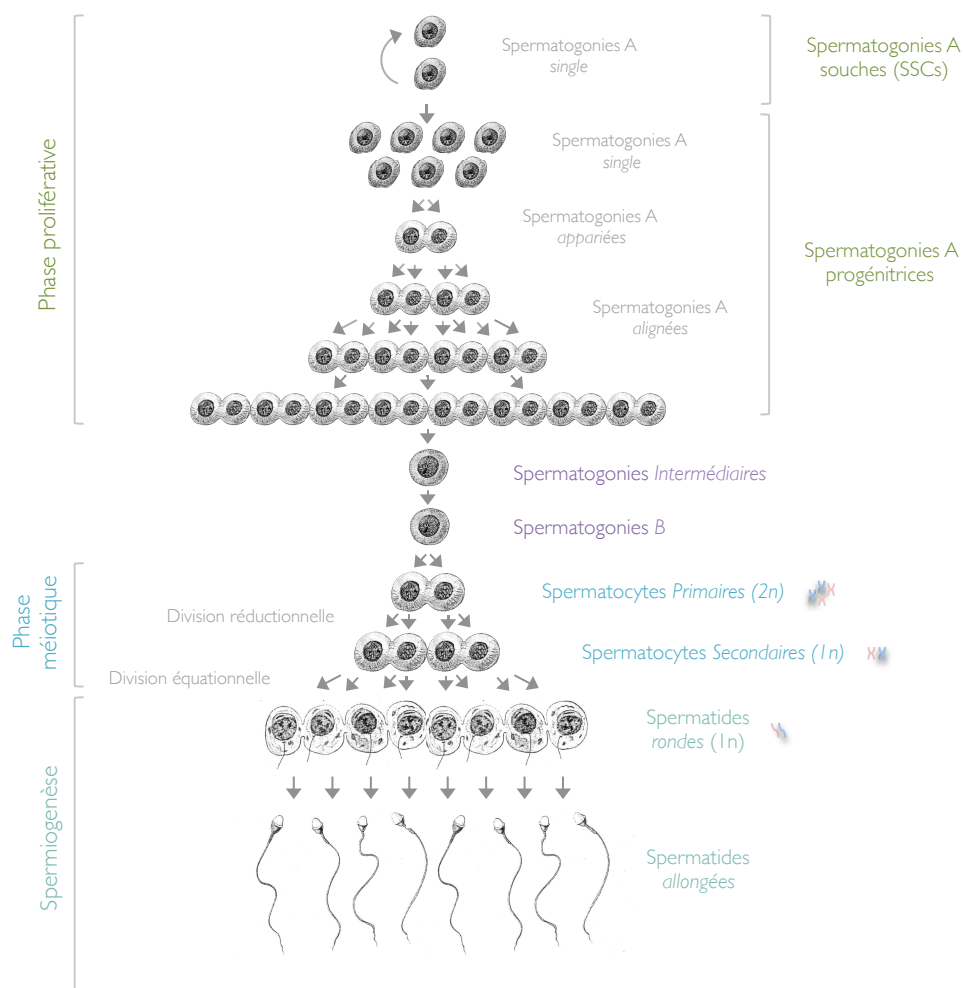


Figure 5. Représentation schématique de la spermatogenèse.

La spermatogenèse se déroule schématiquement en trois phases : proliférative, méiotique et de spermiogenèse. Chacune d'elles est associée à des types cellulaires particuliers de la lignée germinale. Les spermatogonies A souches (SSCs) renouvellent la population de cellules germinales indifférenciées. Les spermatogonies A progénitrices s'amplifient par mitoses successives (As, Aap, Aal) puis engagent leur différenciation en spermatogonies de type intermédiaire et spermatogonies B. Les spermatogonies subissent ensuite une première division méiotique et deviennent spermatocytes primaires ($2n$) puis secondaires ($1n$). Enfin, les spermatocytes évoluent en spermatides rondes puis allongées. Ces dernières donneront naissance aux spermatozoïdes testiculaires.

SSCs, *Spermatogonial Stem Cells* ; As, Spermatogonie A single ; Aap, Spermatogonie A appariées ; Aal, Spermatogonie A alignées

rétinoïque contribue à la mise en place de la barrière hémato-testiculaire (BHT) essentielle au soutien de la gamétogenèse (Chihara et al., 2013).

La spermatogenèse est ainsi initiée dès l'âge de 10 jours chez la souris. La première vague est marquée par une apoptose massive des cellules germinales dont le rôle est déterminant pour le bon déroulement des cycles de spermatogenèse à venir (Jahnukainen et al., 2004, Rodriguez et al., 1997). Ce phénomène physiologique a pour finalité d'adapter le nombre de cellules germinales au nombre de cellules de Sertoli capables d'en assurer la différenciation. En effet, 1 cellule de Sertoli remplit ses fonctions structurales et nutritives vis-à-vis de 50 cellules germinales en moyenne.

Chez la souris, les premiers spermatozoïdes sont détectés dans la lumière du tube à 40-45 jours post-nataux (de Rooij, 1998). Dès lors, le testicule est considéré comme fonctionnel et les cycles de spermatogenèse s'enchaînent.

1.3. Les 3 phases de la spermatogenèse

La spermatogenèse est le processus cyclique par lequel les cellules germinales se différencient au cours de leur progression depuis la lame basale jusqu'à la lumière des tubes séminifère pour aboutir à la formation de spermatozoïdes. La durée de la spermatogenèse est variable selon les espèces. Chez la souris et l'homme elle est respectivement de 35 et 74 jours (Yoshida 2010).

La spermatogenèse peut être décomposée selon 3 phases : la phase proliférative, la phase méiotique et la phase post-méiotique ou spermiogenèse (Figure 5). Chacune d'elles est associée à des types cellulaires particuliers de la lignée germinale.

1.3.1. La phase proliférative

Au contact de la lame basale, les spermatogonies de type A, traditionnellement définies en tant que « spermatogonies indifférenciées », constituent une réserve permanente de cellules germinales dont le renouvellement est essentiel au maintien de la spermatogenèse durant toute la vie de l'individu (de Rooij and Russell, 2000, Oatley and Brinster, 2008). Avec l'amélioration de la sensibilité des techniques d'isolation cellulaire, l'étude de cette population germinale s'est intensifiée au cours de ces dernières années et plusieurs sous-types de spermatogonies A ont été définis (Oatley and Brinster, 2012, Chan et al., 2014).

Les spermatogonies isolées de type As (*A single*) sont capables de deux destins cellulaires (Huckins, 1971, de Rooij and Russell, 2000, Oatley and Brinster, 2012) :

1- Ces dernières peuvent se diviser de manière symétrique et donner naissance à de nouvelles spermatogonies de type As. Elles possèdent ainsi la capacité à renouveler la population de cellules germinales indifférenciées et sont dans ce cadre définies en tant que cellules germinales souches, ou SSCs (*Spermatogonial Stem Cells*). Chez le rongeur, les SSCs représenteraient 10 à 12% de la population de spermatogonies As, soit environ 3 000 cellules chez un individu adulte (Nagano, 2003). Implantées dans un testicule receveur vidé de son contenu germinale, ces dernières sont capables à elles seules de régénérer de manière durable l'épithélium séminifère et d'assurer la continuité des cycles de spermatogenèse (Brinster and Avarbock, 1994, Brinster and Zimmermann, 1994). Mieux définir les caractéristiques et marqueurs moléculaires portés par les SSCs représente aujourd'hui un intérêt majeur. Ceci permettrait d'améliorer la compréhension des événements de différenciation précoces de la lignée germinale et de définir de nouvelles pistes quant à l'origine du cancer germino-testiculaire. A plus long terme, les SSCs ouvrent également des perspectives intéressantes quant à leur utilisation dans le cadre du traitement de l'infertilité (Valli et al., 2014).

2- Les spermatogonies indifférenciées de type As peuvent également s'engager dans le processus de spermatogenèse. Ces dernières ne portent donc pas la caractéristique de cellules souches mais sont considérées en tant que cellules germinales « progénitrices ». A l'issue de la mitose, elles donnent naissance à 2 cellules germinales reliées entre elles par un pont cytoplasmique : les spermatogonies A de type appariées (Apr).

Les spermatogonies Apr s'amplifient par le biais de divisions mitotiques successives. Elles forment des alignements de spermatogonies connectées les unes aux autres par des ponts intercellulaires ou *syntitium*. Ces ponts cytoplasmiques persistent entre les cellules filles de même génération tout au long de la spermatogenèse. Ils permettent le transfert de substances (protéines, ARN messagers) dont l'action synchrone assure la coordination des cellules germinales tout au long de leur maturation (Guo and Zheng, 2004). A l'issue de cette étape d'amplification, les spermatogonies alors désignées sous le terme de spermatogonies A alignées (ou Aal), entrent en différenciation pour atteindre le stade de spermatogonies de type intermédiaire (Int) puis de type B. La spermatogonie B subit une dernière division de mitose qui donne naissance à deux spermatocytes primaires (spermatocytes I).

1.3.2. La phase méiotique

La méiose est un processus de division cellulaire particulier aux cellules de la lignée germinale. Elle est caractérisée par deux étapes de mitoses successives précédées par une phase unique de duplication du matériel génétique (phase S). Engagé en méiose, un spermatocyte I porteur d'un

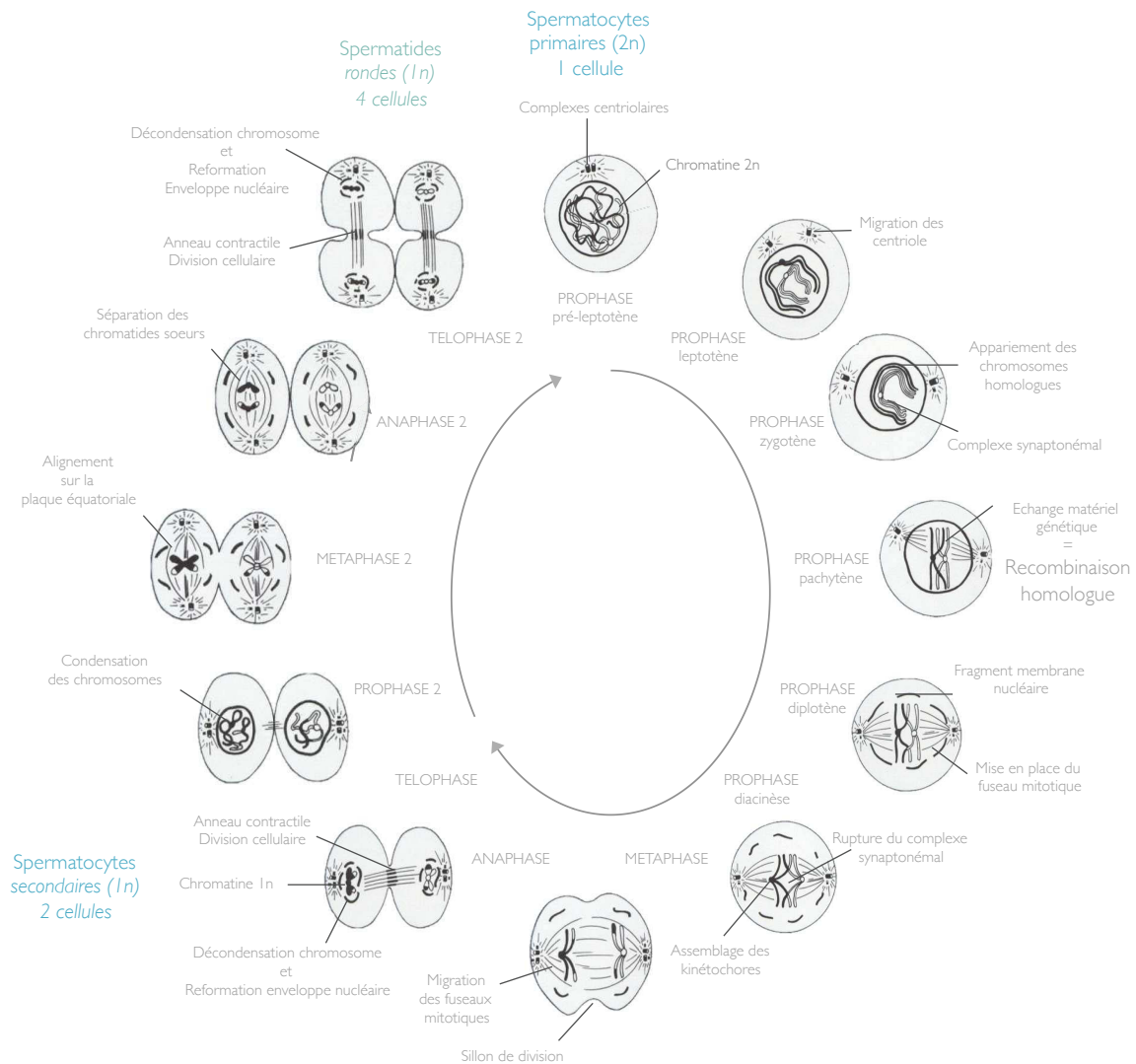


Figure 6. La méiose.

La méiose est une série de deux divisions mitotiques successives. Elle permet à partir d'un spermatocyte I diploïde de donner naissance à quatre cellules haploïdes appelées spermatides. La prophase de la première division est une étape particulièrement longue. Elle comprend 5 phases : leptotène, zygotène, pachytène (recombinaison homologue), diplotène et diacinèse. Au terme de la première division, dite réductionnelle, la séparation des chromosomes paternels et maternels appariés conduit à la formation de spermatocytes II, première génération de cellules haploïdes. Chaque chromosome est alors composé de deux chromatides. La deuxième division dite équationnelle (méiose II), aboutit à la répartition de chacune d'elle dans les deux cellules filles : les spermatides (deuxième génération de cellules haploïdes).

génomme diploïde donne ainsi naissance à 4 cellules filles haploïdes : spermatocytes secondaires ou spermatocytes II (Figure 6).

Chaque division méiotique se décompose en 5 phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase, télophase suivies de la cytotélerèse. La prophase de première division est une étape particulièrement longue qui peut elle même se subdiviser en 5 phases : leptotène, zygotène, pachytène, diplotène, diacinèse. La prophase 1 est marquée par deux événements majeurs. Les spermatocytes leptotènes traversent la barrière hémato-testiculaire lorsque celle-ci s'ouvre transitoirement pour permettre leur progression dans le compartiment apical de l'épithélium séminifère (Li et al., 2009). C'est également au cours de la prophase 1 (phase pachytène) que se déroule un échange de matériel génétique entre deux chromatides de chromosomes appariés. Cette recombinaison homologue permet le brassage de l'information génétique et aboutit à la production de cellules germinales portant une association d'allèles uniques.

Les deux cellules qui résultent de cette première division méiotique sont haploïdes : leur nombre de chromosome est réduit de moitié. Cette première phase de division est ainsi appelée division réductionnelle. La deuxième division méiotique se déroule comme une mitose classique. Les chromatides soeurs de chaque chromosome se répartissent entre les deux cellules filles. Le stock génétique est alors conservé ; cette division est dite équationnelle. Les cellules germinales portent à l'issue de cette phase le nom de spermatides rondes.

1.3.3. La spermiogenèse

La dernière phase de différenciation, ou spermiogenèse, débute immédiatement après la 2^{ème} division méiotique. Les spermatides rondes post-méiotiques se trouvent alors enchâssées dans les cryptes des cellules de Sertoli auxquelles elles sont reliées par des jonctions intercellulaires spécialisées, les jonctions ectoplasmiques apicales (ES, *Ectoplasmic specialization*) (Russell, 1977a).

Chez la souris, la spermiogenèse est décomposée en 16 étapes marquées par des changements morphologiques majeurs de la cellule germinale indispensables à la formation d'un spermatozoïde fonctionnel et de qualité (Figure 7) (Hess and Renato de Franca, 2008, Oakberg, 1956). On peut initialement distinguer les spermatides au noyau arrondi (stades 1 à 8) dont la chromatine homogène permet à ce stade une activité transcriptionnelle réduite consacrée uniquement aux transcrits codant les protéines utiles à la poursuite de la différenciation (essentiellement protéines de transition (Tnp1/Tnp2) et protamines (Prm1/Prm2)) (Barreau et al., 2008, Steger, 1999). Puis les spermatides s'allongent progressivement (stades 8 à 11). Les spermatides matures présentent une chromatine alors

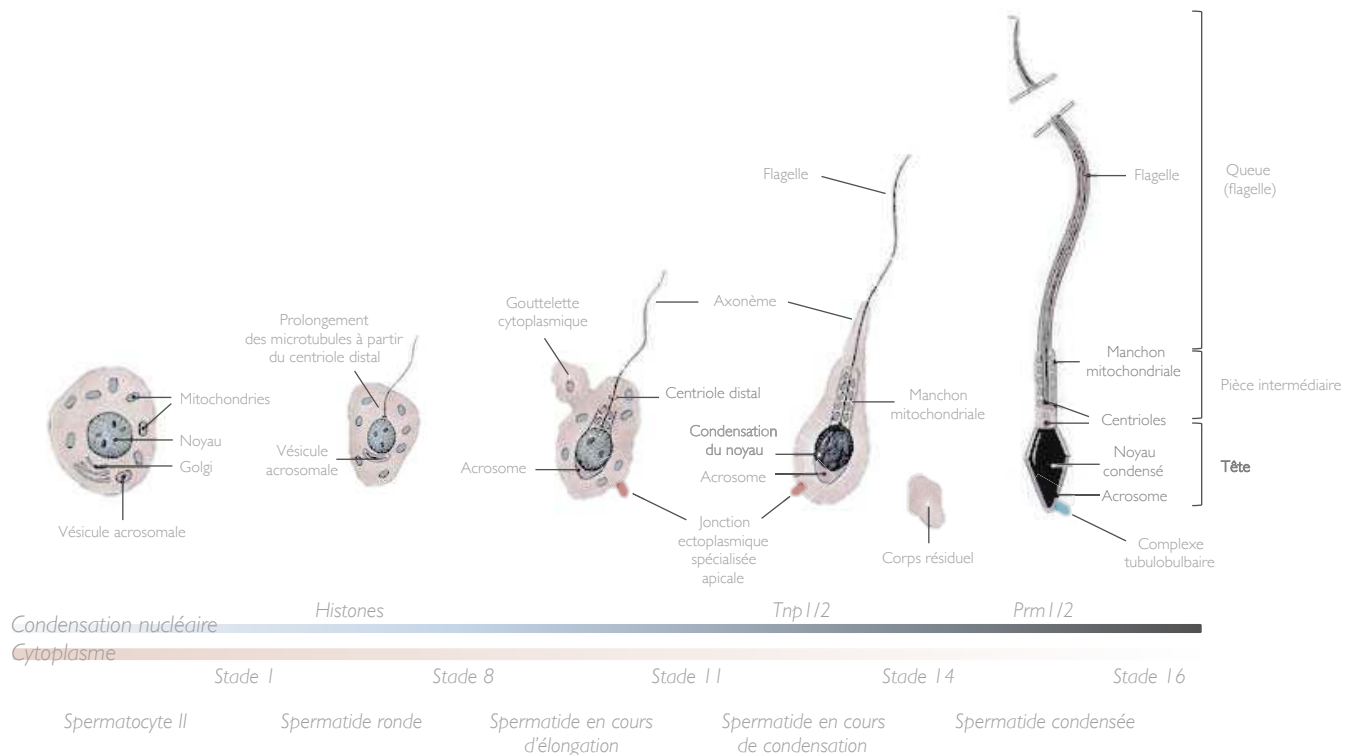


Figure 7. Principales modifications ultra structurales lors de la spermiogénèse.

La spermiogénèse est décomposée en 16 étapes à l'issue desquelles un spermatocyte II se différencie en un spermatozoïde testiculaire. Cette phase de différenciation est marquée par des changements morphologiques majeurs de la cellule germinale. L'appareil de Golgi fusionne pour donner une vésicule unique, l'acrosome. Le centriole distal s'allonge progressivement pour former l'axonème, squelette du futur flagelle. Les spermatides prennent peu à peu une apparence allongée. On les retrouve la tête enchâssée dans le cytoplasme de la cellule de Sertoli à laquelle elles sont reliées par des jonctions spécialisées, les jonctions ectoplasmiques spécialisées apicales (ES apicales). Les mitochondries se regroupent autour de la partie proximale de l'axonème dans la pièce intermédiaire du flagelle. La majeure partie du cytoplasme est éliminée sous la forme de corps résiduels. Le noyau se condense sous l'effet du remplacement séquentiel des histones par les protéines de transition puis par les protamines. Quelques heures avant la spermiation les ES apicales laissent place aux complexes tubulobulbaires. Ces derniers faciliteront la libération des spermatozoïdes testiculaires dans la lumière du tube séminifère.

inactive structurée sous sa forme la plus compacte (stades 11 à 14). La majeure partie du cytoplasme est éliminée et on assiste au développement du flagelle (stades 14 à 16).

a) Elimination du corps résiduel

Durant la spermiogenèse, la quasi-totalité du cytoplasme des spermatides est éliminée sous la forme d'une gouttelette contenant de nombreuses mitochondries, des vésicules golgiennes ainsi qu'une proportion importante d'inclusions lipidiques (Kingsley Smith et Lacy, 1959). Ces corps cytoplasmiques appelés corps résiduels seront pris en charge et phagocytés par les cellules de Sertoli. Les « phagosomes » vont alors migrer de l'apex vers la base des cellules de Sertoli. Au cours de ce trajet, leur membrane est digérée et une partie de leurs composants recyclée pour participer à l'initiation et au soutien d'un nouveau cycle de spermatogenèse.

b) Développement du flagelle

Le flagelle se développe dès les premiers stades de la spermiogenèse. Les microtubules issus du centriole distal s'assemblent pour former le squelette du flagelle : l'axonème. Ce dernier est associé à de nombreuses protéines (ex : dynéïne) et est entouré à sa base d'une densité importante de mitochondries. Elles constitueront respectivement les moteurs et le « carburant » (ATP, *Adenosine triphosphate*) nécessaire au mouvement du flagelle.

c) Développement de l'acrosome

Les multiples vésicules de l'appareil de Golgi migrent et fusionnent pour former une vésicule unique recouvrant les 2/3 supérieurs du noyau : l'acrosome (Ramalho-Santos et al., 2001). Son contenu s'apparente fonctionnellement aux lysosomes. Il contient des enzymes hydrolytiques (hyaluronidases, proacrosine...) dont l'activité est essentielle à la progression des spermatozoïdes à travers la zone pellucide de l'ovocyte lors de la fécondation.

d) Compaction de la chromatine

Au cours de la spermiogenèse, le noyau des spermatides s'allonge et la chromatine se condense progressivement pour lui donner une apparence compacte. Cette étape est marquée par un remaniement majeur de la structure chromatinienne. Les histones associées à l'ADN se trouvent en grande majorité remplacées par de petites protéines basiques dites de transition (Tnp1 et Tnp2), qui seront elles-mêmes remplacées par d'autres protéines nucléaires spécifiques au testicule : les protamines (Prm1 et Prm2) (Wouters-Tyrou et al., 1998). Particulièrement riches en résidus cystéine, ces dernières seront étroitement associées les unes aux autres par de nombreux ponts disulfures et

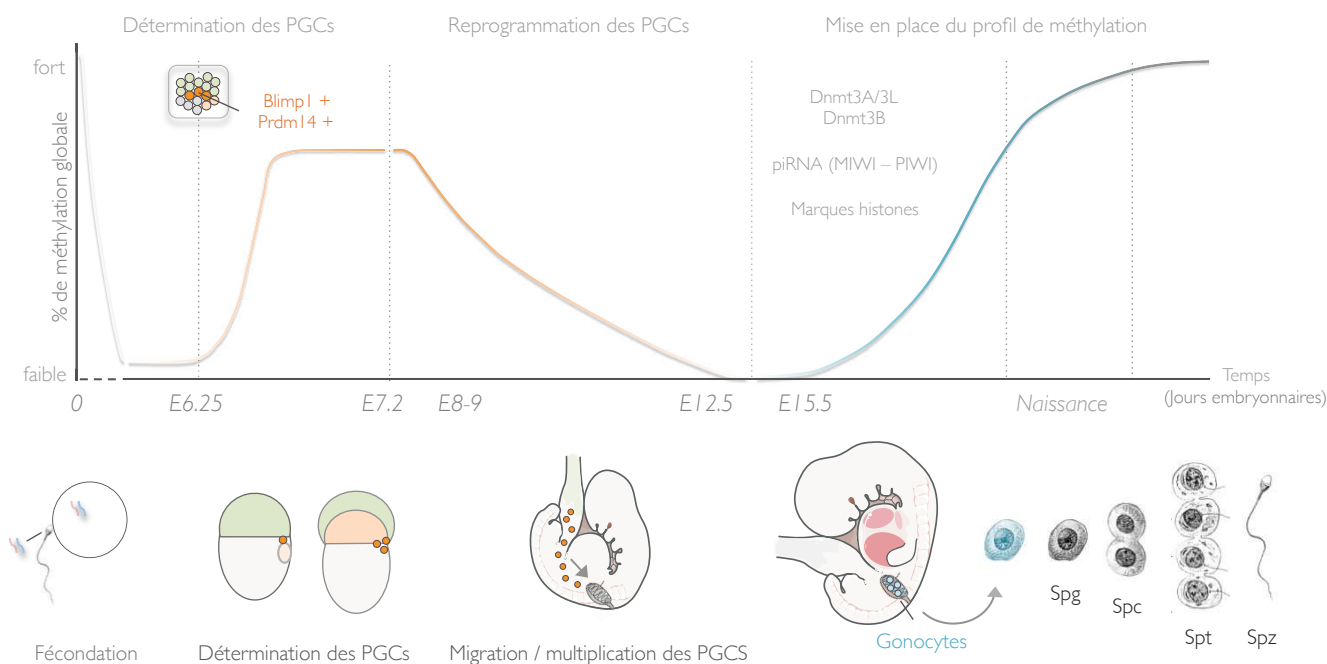


Figure 8. Cinétique d'acquisition de la méthylation de l'ADN au cours du développement de la lignée germinale mâle chez la souris.

Suite à la fécondation, le développement embryonnaire est marqué par une reprogrammation globale des génomes parentaux. L'ADN spermatique est activement déméthylé à l'exception des gènes soumis à empreinte. A E6.25, l'expression des facteurs de transcription Blimp1 et Prdm14 induit le programme transcriptionnel nécessaire à la détermination des PGCs. Dès 7,2, et tout au long de leur migration jusqu'aux ébauches gonadiques, les PGCs subiront une deuxième vague de déméthylation nécessaire au rétablissement de leur caractère totipotent. La quasi totalité des méthylations du génome acquises durant les premières phases de développement ainsi que celles héritées des génomes parentaux sont retirées. A partir de E15,5, le profil de méthylation est rétabli progressivement dans les gonocytes quiescents sous la gouvernance des enzymes Dnmt3a, Dnmt3b et du co-facteur Dnmt3l. Leur action sera guidée par certaines marques d'histones ainsi que par la génération de piRNAs. La méthylation *de novo* concernera en premier lieu les éléments transposables ainsi que les gènes soumis à empreinte paternelle. Bien que majoritaire en période embryonnaire, l'action des Dnmt se poursuivra en périnatal puis à l'âge adulte. Elle sera alors essentielle à la progression de la différenciation des cellules germinales. L'entretien des profils de méthylation sera quant à lui essentiel au maintien de la stabilité du génome. A la fin de la spermatogenèse 90% du génome du gamète est méthylé.

E, jours embryonnaires ; Blimp1, *B Lymphocyte-induced maturation protein-1* ; Prdm14, *PR Domain-containing protein-14* ; Dnmt, *DNA methyl transferase* ; Spg, spermatogonies ; Spc, spermatocytes ; Spt, spermatide ; Spz, spermatozoïdes

permettront un état de compaction maximal de l'ADN. Le génome devient ainsi moins perméable et donc moins sensible aux agressions physiques et chimiques générées en présence d'agents mutagènes (Cho et al., 2001). L'intégrité de l'information génétique est alors préservée tout au long de la progression des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles et femelles jusqu'à la fécondation (Cho et al., 2001). Cette structure chromatinienne particulière est donc déterminante pour assurer le maintien de l'intégrité du bagage génétique transmis à la descendance (Rousseaux et al., 2008)(Ward and Coffey, 1991). La forme qu'elle confère au noyau permettrait également de favoriser la pénétration du spermatozoïde au sein de l'ovocyte (Malo et al., 2006). L'intégration des protamines participe également à la constitution d'un code épigénétique à part entière essentiel à l'établissement du programme transcriptionnel du zygote lors des premières étapes de développement (Braun, 2001, Carrell et al., 2007, de Mateo et al., 2007).

1.3.4. Spermiation et maturation post-testiculaire

La spermatogenèse s'achève par la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. Cette étape, appelée spermiation fait intervenir de manière active les cellules de Sertoli qui vont permettre de faciliter la dissociation et le relargage des spermatozoïdes testiculaires (O'Donnell et al., 2011).

A ce stade, le spermatozoïde est immobile et incapable de fécondation. Il possède néanmoins toutes les structures nécessaires à la poursuite de sa maturation. C'est dans l'épididyme qu'il va acquérir sa mobilité linéaire ainsi que l'aptitude à reconnaître et se fixer à la zone pellucide de l'ovocyte (Brown et al., 1983). D'autre part, sa chromatine continue à se condenser par la poursuite de la formation de ponts disulfures entre les protamines (Hi and Jm, 1971).

Il est à noter que le spermatozoïde subira d'autres événements de maturation dans les voies génitales femelles. L'événement de capacitation (acquisition d'une mobilité circulaire, hyperactivité flagellaire) est en effet nécessaire à l'obtention d'un gamète fécondant (Bedford, 1970).

1.4. Epigénétique et spermatogenèse

Tout au long de leur phase de migration pour rejoindre les crêtes génitales, les PGCs subissent un remaniement chromatinien global nécessaire à l'acquisition d'un nouveau profil épigénétique particulier aux cellules de la lignée germinale. La quasi totalité des méthylations du génome acquises durant les premières phases de développement ainsi que celles héritées des génomes parentaux est alors retirée (éléments transposables, gènes à empreinte parentale...) (Figure 8) (pour revue : Apostolou and Hochedlinger, 2013). Les PGCs possèdent à nouveau un épigénome naïf associé au

rétablissement de leur caractère totipotent. Cette reprogrammation permet par la même occasion de limiter l'accumulation d'épi-mutations provenant des génomes parentaux (Hajkova et al., 2002).

1.4.1. Mise en place de l'épigénome des cellules germinales

Chez la souris, la perte de l'épigénome des PGCs est complète à E12.5. A partir de cet état naif, les PGCs vont subir une série d'événements chromatinien nécessaires au maintien de la stabilité de leur génome et à leur progression dans les différentes phases du processus de différenciation. Aussi, l'intervention séquentielle de multiples acteurs épigénétiques permet de réguler la dynamique d'expression de gènes clefs de la spermatogenèse. Les cellules germinales sont également le siège de remaniements chromatinien uniques. Au cours des stades pré-méiotiques, la méthylation de l'ADN permet la mise en place de l'empreinte paternelle et l'inactivation des éléments transposables nécessaires à la progression de la méiose. Enfin, lors de la spermiogenèse, on assiste à une réorganisation des composants de la chromatine durant laquelle la quasi-totalité des histones est éliminée au profit de l'intégration des protamines.

a) Méthylation de l'ADN

Le profil de méthylation de l'ADN est rétabli progressivement dans les gonocytes quiescents dès 15.5 jours embryonnaires. La méthylation *de novo* se poursuit en périnatal dans les spermatogonies et sera maintenue durant les stades méiotiques jusqu'à l'obtention de la cellule haploïde (Kato et al. 2007, Oakes et al., 2007). La ré-acquisition du profil de méthylation est indispensable au bon déroulement de la spermatogenèse et particulièrement à l'entrée et à la progression de la méiose. A la fin de la spermatogenèse, 90% du génome du gamète est méthylé (Kobayashi and Kono, 2012).

i Les méthyl-transférases de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle (-CH₃) sur le cinquième carbone des cytosines dans un contexte de dimère CpG (Cytosine-p-Guanine) (Hotchkiss, 1948, Hermann et al., 2004). Dans les cellules germinales, comme dans les cellules somatiques, la méthylation touche principalement les rétrotransposons, les régions répétées ainsi que les régions différentiellement méthylées (DMRs, *Differentially Methylated Regions*) des gènes dont l'expression est soumise à empreinte parentale (Chen and Li, 2006, Illingworth and Bird, 2009). Les CpGs sont également, présents organisés en îlots sur le promoteur de gènes à copie unique ; leur dynamique de méthylation-déméthylation est alors en lien avec le contrôle de leur expression (Rottach et al., 2009).

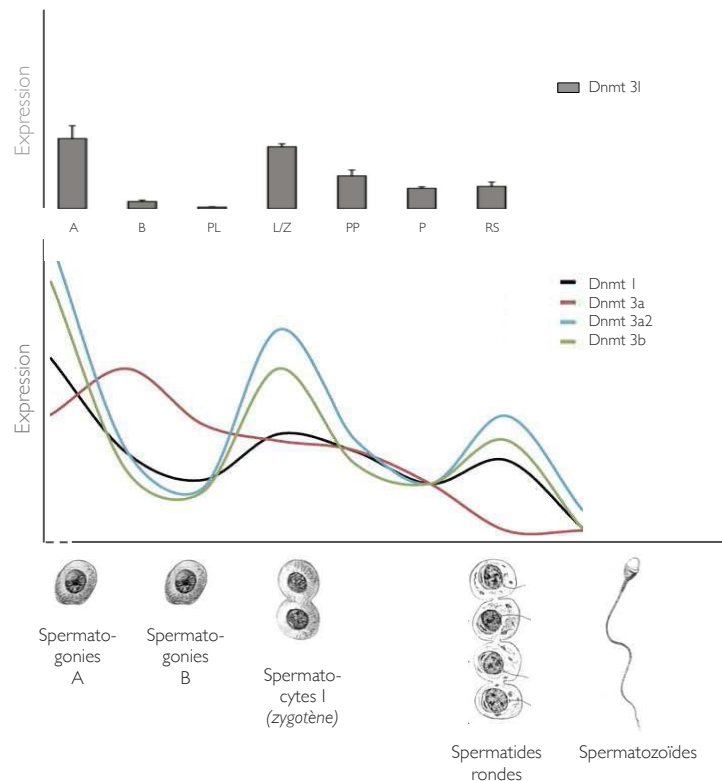


Figure 9. Expression des méthyl-transférases de l'ADN au cours des différents stades de la lignée germinale chez la souris.

Quantification relative des taux de transcrits *Dnmt3l*, *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3a2* et *Dnmt3b* dans les différentes sous-populations cellulaires du testicule de souris.

Dnmt, *DNA methyl transferase* ; A, spermatogonies de type A ; B, spermatogonies de type B ; PL, spermatocytes pré-leptotènes ; L/Z, spermatocytes leptotènes/zygotènes ; PP, spermatocyte pachytènes prépubertaires ; P, spermatocytes pachytènes ; RS, spermatides rondes. *Composé d'après La Salle et al. 2006, et La Salle et al. 2007.*

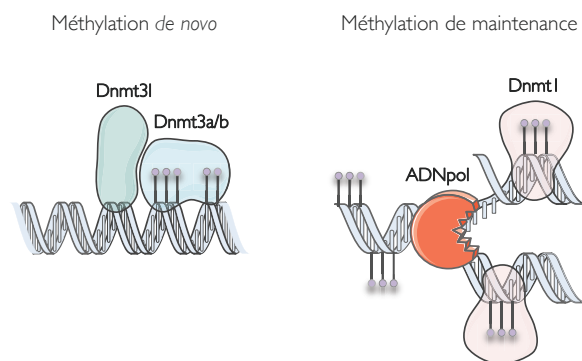


Figure 10. Représentation simplifiée de la méthylation *de novo* et de la méthylation de maintien.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le 5ème carbone des cytosines dans un contexte de dimère CpG. (*Gauche*) *Dnmt3a* et *3b* sont des ADN méthyltransférases *de novo*. Elles établissent les nouveaux patrons de méthylation du génome. Leur action est orchestrée par la présence de *Dnmt3l* qui, contrairement à ses homologues, ne porte pas d'activité catalytique méthyltransférase. (*Droite*) La *Dnmt1* est impliquée dans le maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires. Son action est adressée au niveau sites CpG hémi-méthylés au sein de la fourche de réplication. Elle reproduira l'ensemble des profils de méthylation déjà mis en place au cours du développement et/ou de la gamétogenèse.

Dnmt, *DNA methyl transferase* ; ADNpol II, *ADN polymerase* ;  , résidus 5-méthyl-cytosines

Les acteurs de la méthylation *de novo* de la lignée germinale mâle sont aujourd'hui bien caractérisés. Chez la souris comme chez l'homme, elle met en jeu l'action des membres de la famille des méthyl-transférases de l'ADN de type 3 : Dnmt3a, Dnmt3b et Dnmt3l (*Dna methyltransferase*) (Okano et al., 1999, Chedin et al., 2002). Fortement exprimées au sein des gonocytes en période fœtale, leur transcription est maintenue active dans la lignée germinale adulte (Watanabe et al., 2004a, La Salle and Trasler, 2006, La Salle et al., 2007). On les retrouve alors essentiellement concentrées au niveau de stades pré-méiotiques (spermatogonie A et B) et du stade zygotène des spermatocytes (Figure 9). Les transcrits des *Dnmt3a* et *3b* sont également détectés aux stades de spermatides rondes ; l'activité des Dnmts correspondantes serait impliquée dans la méthylation *de novo* de gènes spécifiques du testicule (Omisano et al., 2007, La Salle et al., 2004, La Salle and Trasler, 2006). Contrairement aux Dnmt3a et b, Dnmt3l ne porte pas d'activité catalytique méthyltransférase. Son rôle est néanmoins primordial pour guider l'action de ses deux homologues et orchestrer la cinétique d'acquisition de la méthylation sur des séquences déterminées (Figure 10) (Chedin et al., 2002, Chen et al., 2005, Bourc'his and Bestor, 2004).

Dnmt1 est quant à elle impliquée dans le maintien de la méthylation au cours des divisions cellulaires (Fatemi et al., 2002, Hsieh, 2005). Certaines études lui attribuent également un rôle pour la méthylation *de novo* et ce en collaboration avec Dnmt3a (Jones and Liang, 2009, Gowher et al., 2005).

ii Histones et petits ARNs : les guides de la méthylation *de novo*

L'intervention des Dnmts dans la lignée germinale suit une dynamique précise au cours du développement embryonnaire et de la gamétogenèse. Celle-ci est entre autre permise par la régulation de leur expression (méthylation de leur propre promoteur, facteurs de transcription Sp1-Sp3 ou encore miRNA, Jinawath et al., 2005, Kishikawa et al., 2002, Meunier et al., 2012), mais également par le contrôle de leur activité méthyl-transférase.

Dans la lignée germinale, l'action des Dnmts est guidée sur le plan spatio-temporel par d'autres mécanismes épigénétiques. On sait aujourd'hui que l'établissement de la méthylation sur une séquence d'ADN particulière s'accompagne de modifications post-traductionnelles des histones (Figure 11). Des études biochimiques ont démontré que la présence de résidus H3K4 méthylés ne permettait pas la fixation des protéines du complexe de méthylation *de novo* (Ooi et al., 2007, Zhang et al., 2010). Aussi, l'invalidation de la déméthylase H3K4me1/2 Kdm1b (LSD1, *Lysine (K)-specific demethylase 1B*) dans les ovocytes entraîne un défaut de mise en place de l'empreinte (Ciccone et al., 2009). A l'inverse, la marque H3K36me3, apposée à la suite d'un événement transcriptionnel, favorise le recrutement de Dnmt3a et permet d'initier l'action du processus de méthylation sur des régions

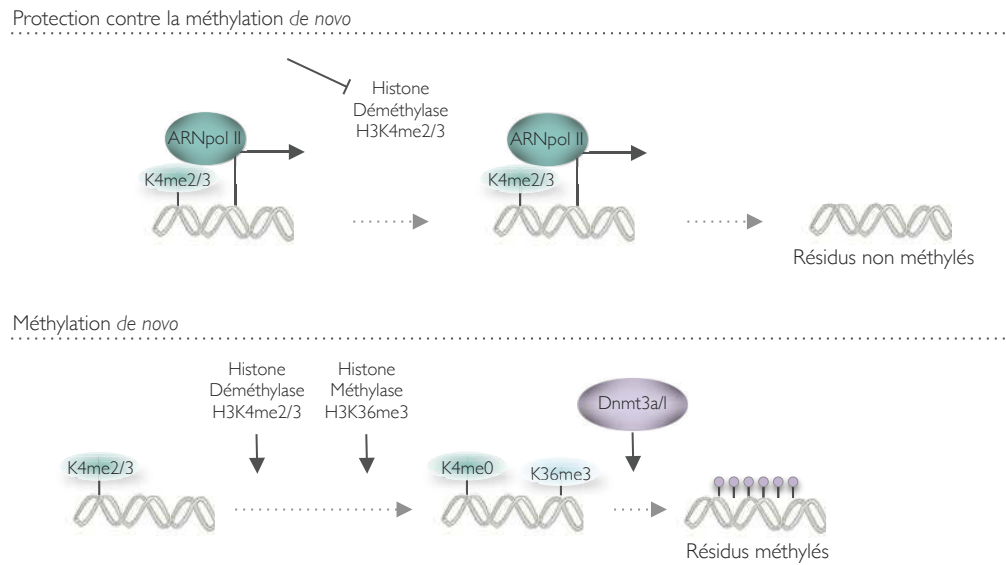


Figure 11. Contexte chromatinien : guide de la méthylation *de novo* de la lignée germinale murine.

La présence de résidus H3K4me2/3 est défavorable au recrutement des Dnmt3a/l à la chromatine et protège l'ADN de la méthylation *de novo*. À l'inverse, la marque H3K36me3, apposée à la suite d'événements transcriptionnels, favorise l'intervention du complexe de méthylation Dnmt3a/l à l'ADN.

Dnmt, DNA methyl transferase ; ARN Pol II, ARN polymérase 2

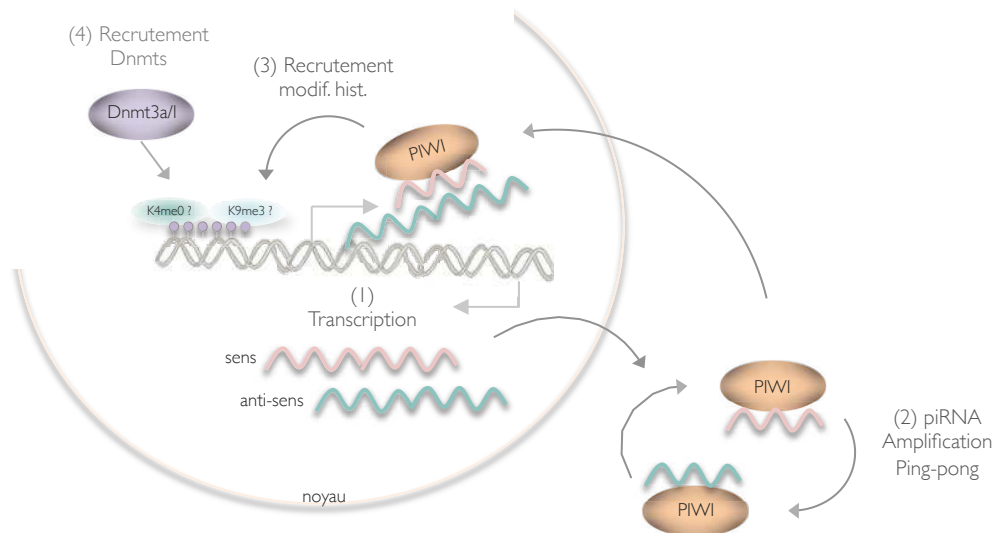


Figure 12. Modèle de mise en place des profils de méthylation par les piRNA dans la lignée germinale mâle.

(1) Les ARNs précurseurs sens et antisens des piRNA sont transcrits à partir de l'expression transitoire des éléments transposables. (2) Acheminés jusqu'au compartiment cytoplasmique, les pré-piRNA seront associés aux complexes PIWIs. Ces derniers prendront en charge leur clivage permettant la génération et l'amplification des piRNA correspondants. (3) et (4) De retour au noyau, les complexes PIWI-piRNA permettraient, par complémentarité de séquence, le recrutement d'enzymes de modification d'histones (H3K4 déméthylation, H3K9 méthylation) favorisant la méthylation *de novo* des séquences régulatrices des éléments transposables.

Dnmt, DNA methyl transferase

spécifiques (Dhayalan et al., 2010). Dans les gonocytes à E17.5, la transcription des régions à empreinte parentale sous l'influence des DMRs H19 et Igf2 est concomitante à l'acquisition de leur profil de méthylation (Henckel et al., 2012). La création d'un contexte chromatinien particulier par la modification des histones pourrait ainsi, à lui seul, constituer un événement épigénétique suffisant pour le contrôle de l'empreinte.

La méthylation du génome des cellules germinales est également conduite par la génération de petits ARN non codants de la famille des piRNA (Aravin and Bourc'his, 2008). Ces ARNs d'une longueur de 24 à 30 nucléotides sont retrouvés spécifiquement dans la lignée germinale où ils sont associés aux protéines de la sous-famille Piwi, Miwi (Piwil1) et Mili (Piwil2), toutes deux exprimées dans le testicule (Banisch et al., 2012, Carmell et al., 2007, Kuramochi-Miyagawa et al., 2001). Leur rôle est aujourd'hui bien décrit dans le cadre de la répression transcriptionnelle des éléments transposables. Les souris mâles invalidées pour le gène codant *Mili* présentent un défaut de méthylation des éléments transposables et une stérilité consécutive à un défaut de spermatogenèse tel qu'observé chez les souris *Dnmt3l*^{-/-} (Kuramochi-Miyagawa et al., 2008). D'autre part, l'invalidation du gène *Miwi* provoque un arrêt de gamétogenèse au stade plus tardif de spermatide ronde (Deng and Lin, 2002). Pour autant, le lien moléculaire entre les piRNA et les phases de spermiogenèse restent à ce jour inconnu. La mise en place de l'empreinte parentale sur le locus *Rasgrf1-DMR* ferait également intervenir des ARNs non codants (Watanabe et al., 2011). La mécanique mise en jeu des petits ARNs pour le recrutement des Dnmts reste pour le moment à démontrer. Le modèle actuel est basé sur ce qui est observé chez la levure (Figure 12) (Zofall and Grewal, 2006) : les petits ARNs, générés à partir de l'expression transitoire d'éléments transposables et amplifiés par le système Piwi, cibleraient la région génomique dont ils sont issus par complémentarité de séquence. Ils permettraient alors le recrutement d'acteurs de modifications post-traductionnelles des histones nécessaires à l'établissement d'un contexte chromatinien favorisant l'ancrage du complexe Dnmts.

iii Séquences méthylées

Bien que la majorité du profil de méthylation du génome de la lignée germinale soit acquis dès la naissance, son maintien à l'âge adulte est essentiel au bon déroulement des cycles de gamétogenèse. Des anomalies de méthylation de la lignée germinale sont montrées, chez l'homme, comme associées à l'infertilité (Kobayashi et al., 2007, Marques et al., 2004, Poplinski et al., 2010, Boissonnas et al., 2010). Dans ce contexte, l'activité anormale des DNMTs pourrait engendrer des erreurs de la mise en place ou de la maintenance des profils de méthylation (Boissonnas et al. 2009, Marques et al. 2009).

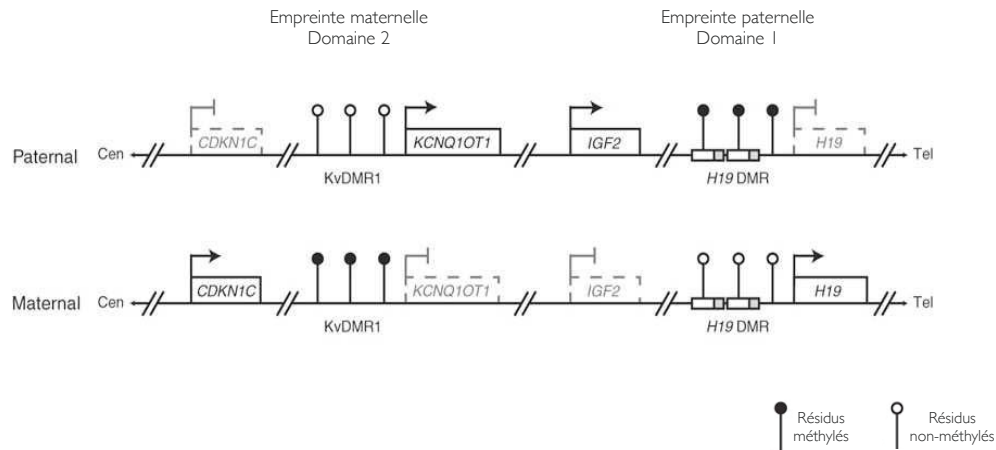


Figure 13. Organisation d'un cluster de gènes à empreinte parentale : exemple des locus *Igf2* et *Kcnq1ot1* chez la souris.

La région distale du chromosome 7 murin comporte deux domaines d'empreinte indépendants (KvDMR1 et H19-DMR).

H19-DMR, empreinte paternelle (Droite) : *H19* s'exprime à partir de l'allèle maternel tandis que *Igf2* est transcrit à partir de l'allèle paternel. Sur le chromosome maternel, le DMR n'est pas méthylé ce qui autorise le recrutement du facteur CTCF. Sa présence en tant qu'élément insulateur bloque l'action des séquences régulatrices de type *enhancers* pour la transcription de *Igf2*. A l'inverse, sur le chromosome paternel, la méthylation du DMR empêche la liaison de CTCF ce qui permet l'expression de *Igf2*.

KvDMR1, empreinte maternelle (Gauche) : La région à empreinte dépendante de KvDMR1 comporte une dizaine de gènes. Sur l'allèle maternel, la méthylation du *KvDMR1* réprime l'expression du transcrit long-codant *Kcnq1ot1*. Exprimé uniquement à partir de l'allèle paternel, *Kcnq1ot1* permet la création d'un contexte chromatinien défavorable à la transcription de gènes à expression maternelle situés sur le locus (ex. *Cdkn2*).

DMR, *differential methylated region* ; *Igf2*, *Insulin growth factor 2* ; CTCF, *CCCTC-binding factor* ; *Cdkn1c*, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C*

- *Répression des éléments transposables*

La méthylation *de novo* concerne en premier lieu les éléments transposables réveillés par les vagues de déméthylation lors de la reprogrammation des PGCs. Cette étape, initiée dès les stades gonocytes, est indispensable à la progression de la gamétogenèse à l'âge adulte. Aussi, l'invalidation chez la souris de *Dnmt3l* dans la lignée germinale entraîne un défaut de répression transcriptionnelle des éléments transposables de type IAP (*Intracisternal A-particle*) ou LINE (*Long interspersed nuclear element*) (Bourc'his and Bestor, 2004; Hata et al., 2006, Webster et al., 2005). Ceci conduit à un alignement anormal de leur séquence au cours des événements de recombinaison méiotique et à un arrêt prématuré de la spermatogenèse. D'autre part, la déméthylation transitoire d'éléments transposables lors des phases pré-méiotiques de chaque cycle de gamétogenèse à l'âge adulte, suggère que l'action des Dnmts, bien que majoritaire en période embryonnaire, soit requise tout au long de la vie de l'individu afin de garantir la stabilité du génome et la poursuite de la gamétogenèse (van der Heijden and Bortvin, 2009). Ceci est illustré chez la souris mâle par les conséquences de l'administration à l'âge adulte d'un inhibiteur de la méthylation de l'ADN (5-azacytidine, 5-aza-2'-déoxycytidine) ; au terme du traitement, les animaux présentent une réduction du nombre de gamètes en lien avec l'arrêt de la gamétogenèse dès les stades méiotiques (Kelly et al., 2003). La réinjection de spermatogonies souches invalidées pour *Dnmt3a* et *b* dans le testicule de souris sauvages adultes montre que celles-ci sont incapables de générer une spermatogenèse complète. On assiste alors à un arrêt de la spermatogenèse au stade méiotique associé à la réactivation de certains éléments transposables (IAP, LINE-L1) (Takashima et al., 2009).

- *Mise en place de l'empreinte*

Chez les mammifères, alors que la plupart des gènes sont exprimés de façon bi-allélique, l'empreinte parentale permet dans la lignée somatique de déterminer l'expression d'un certain nombre de gènes en fonction de leur origine allélique. On parle alors d'expression parentale ou mono-allélique (Barlow, 2011). On compte aujourd'hui 130 gènes soumis à empreinte chez la souris (Schulz et al., 2008). Ces derniers sont organisés en régions chromosomiques, ou *cluster*, comportant une séquence régulatrice (DMRs, ICR, *Imprinted Control Region*) dont le statut de méthylation dépend de son origine allélique (Figure 13). La plupart des DMRs sont méthylés sur l'allèle maternel (ex. *Igf2r*, *Snrpn*) et il est dénombré à ce jour quatre régions sous l'influence de l'empreinte paternelle : *H19-Igf2*, *Dlk1-Gtl2*, *Gpr1-Zbdf2* et *Rasgrf1-DMRs* (Thorvaldsen et al., 1998, Yoon et al., 2002, Lin et al., 2003, Kobayashi et al., 2009). Au cours de la migration des PGCs, l'empreinte des gènes à expression parentale est effacée et un nouveau profil de méthylation sera alors apposé de manière homogène sur le génome des gamètes selon le sexe du nouvel embryon.

Dans les spermatogonies issues des souris mâles invalidées pour le gène codant *Dnmt3l* une altération des niveaux de méthylation des DMRs, plus ou moins importante selon le locus considéré, souligne l'implication de la machinerie des Dnmts pour l'acquisition de l'empreinte paternelle (Bouc'his and Bestor, 2004 ; Kato et al., 2007). Aussi, l'invalidation spécifique de *Dnmt3a* dans la lignée germinale conduit au défaut de méthylation des gènes à empreinte *H19* (*H19-DMR*), *Dlk1-Gtl2* (*IG-DMR*) (Kaneda et al., 2004). On sait aujourd'hui que la mise en place de l'empreinte parentale n'a pas uniquement lieu durant le développement embryonnaire mais que certains DMRs (DMRs des régions *H19-Igf2*, *Rasgrf1* et *Dlk1-Gtl2*) finissent d'acquérir leur profil de méthylation entre les stades de spermatogonie A et le stade pachytène lors de la spermatogenèse adulte (Oakes et al., 2007). Chez l'homme, des défauts de méthylation des DMRs à empreinte paternelle (*H19-DMR*), ou la méthylation aberrante des DMRs à empreinte maternelle (*PLAG1*, *DIRAS3*, *HRAS*, *NTF3*, *MT1A*, *PAX8*, *SFN*, *LIT1*), sont associés à une mauvaise qualité spermatique (Kobayashi et al., 2007, Marques et al., 2004, Poplinski et al., 2010, Boissonnas et al., 2010). Donc, la transmission par les spermatozoïdes de cette altération au génome du zygote a des conséquences importantes sur le développement du futur embryon, son métabolisme ou son comportement (Ferguson-Smith et al., 2004). Elle est notamment associée à de nombreux syndromes ; les syndromes de Beckwith-Weidemann ou de Silver-Russel résultent tous les deux d'une altération d'empreinte sur le locus *H19-IGF2*. L'exposition de modèles animaux à des perturbateurs de type endocriniens tels que la vinclozoline a été démontrée comme associée à une altération de l'épigénome de la lignée germinale et à un défaut de spermatogenèse qui sera transmis sur plusieurs générations (Anway et al., 2005).

- *Promoteurs de gènes et progression de la différenciation*

La méthylation du génome germinale contrôle également la cinétique d'expression de gènes impliqués dans la progression de la spermatogenèse. Ceci est par exemple illustré par la dynamique du statut de méthylation des régions promotrices des gènes codant les Protamines 1 et 2 (*Prm1/2*) ou la protéine de transition *Tnp1* ; protéines dont l'intervention est nécessaire lors des stades tardifs de la gamétogenèse. Tandis que les séquences associées à *Tnp1* sont déméthylées au fur et à mesure de la différenciation, celles associées aux *Prm1/2* se voient progressivement méthylées et n'acquièrent leur profil complet que durant les stades méiotiques (Trasler et al., 1990, Ariel et al., 1991). C'est également le cas d'autres séquences uniques telles que celles codant les gènes *Abt1* (*activator of basal transcription 1*), *Tcf3* (*Transcription factor 3*) ou *Polg* (*DNA polymerase gamma*) ; leur profil de méthylation ne sera achevé qu'au cours de la différenciation des cellules germinales entre le stade de spermatogonie de type A et le stade spermatocyte pachytène (Oakes et al., 2007).

Le rôle déterminant des processus de méthylation de l'ADN pour le maintien du statut de différenciation de la lignée germinale est notamment illustré par les données obtenues dans le cadre de

cancers testiculaires chez l'homme. Une hypométhylation globale du génome a été également mise en évidence dans des tumeurs germinales de type séminomes ou néoplasies germinales (Netto et al., 2008). A l'inverse une hyperméthylation globale est observée dans des tumeurs de type non séminomateuses (Netto et al., 2008). D'autre part, plusieurs études décrivent une altération de l'expression des *DNMTs* dans le cadre de tumeurs testiculaires. Des niveaux élevés de transcrits codant *DNMT3A*, *B* ou *L* sont retrouvés au niveau de tumeurs germinales (carcinome embryonnaires) (Biermann et al. 2007, Godmann et al. 2009). De rares études associent à ce jour le développement tumoral à l'altération du statut de méthylation de séquences de gènes spécifiques. Le gène suppresseur de tumeur *RASSF1A* (*Ras association domain family 1 isoform*) est hyperméthylé dans 40% des cas de cancers germino-testiculaires de type séminomes et 80% des cas de non séminomes (Godmann et al. 2009).

b) Modifications post-traductionnelles des histones

En plus de la méthylation de l'ADN, de nombreuses modifications épigénétiques associées au code histone ont lieu au cours de la spermatogenèse. Comme évoqué précédemment, certaines permettent de signaler les séquences d'ADN devant être méthylées (H3K4me – H3K36me). D'autres telles que l'intégration de variants d'histones et l'hyperacétylation de l'histone H4 sont essentielles à l'initiation des étapes de condensation de la chromatine lors de la spermiogenèse.

Le code histone permet également de réguler l'expression d'acteurs clefs des différentes phases de la spermatogenèse. Les travaux de Zhang ont montré que la déméthylase *Jmjd1A* (*JmjC-domain-containing histone demethylase 2A* ou *Kdm3a*, *Lysine-specific demethylase 3A*), qui déméthyle spécifiquement les résidus H3K9me₃, est nécessaire à la spermatogenèse (Okada et al., 2010). Son invalidation chez la souris conduit à une infertilité associée à un défaut de compaction du noyau des spermatides. L'analyse des promoteurs de *Prm1* et *Tnp1* montre une accumulation de la méthylation de H3K9 par rapport aux souris sauvages conduisant à une répression de l'expression de ces protéines nécessaires à la condensation de la chromatine.

L'acquisition d'autres marques est essentielle sans pour autant que leur rôle moléculaire précis pour le contrôle d'évènements clefs de la spermatogenèse ne soient identifiés à ce jour. L'histone méthyltransférase G9a (*KMT1C*, *histone lysine methyltransferases 1C*) est exprimée durant les stades précoces de la spermatogénèse, dans les spermatogonies et le stade leptotène. Son invalidation chez la souris mâle conduit une infertilité associée à un arrêt de spermatogenèse au stade pachytène (Tachibana et al., 2007). Dans les stades plus tardifs, la méthylation de H3K9 est assurée par les enzymes Suv39-h1 et Suv39-h2 (Smith et al., 2003). Les souris *Suv39h1/2-/-* sont stériles ; dans les cellules germinales, le défaut de marque H3K9me au niveau des régions chromosomiques péri-

centromériques est associé à une perturbation des étapes de recombinaison homologue lors de la méiose et à une instabilité génomique (Peters et al., 2001). Enfin, l'histone méthyl transférase Ezh2 (*Enhancer of zeste 2*), à l'origine de la marque H3K27me3, a été mise en évidence au niveau des spermatides ronds. Sa colocalisation avec le variant d'histone H1t2 suggère qu'elle puisse participer à son intégration à la chromatine (Lambrot et al., 2012).

c) *La transition histone-protamine*

La spermatogenèse est marquée par un remaniement unique de la structure chromatinienne. Au moment de la spermiogenèse, les histones associées à l'ADN se trouvent en grande majorité remplacées par de petites protéines basiques dites de transition (Tnp1 et Tnp2), qui seront elles-mêmes remplacées par d'autres protéines nucléaires spécifiques au testicule : les protamines (Prm1 et Prm2) (Wouters-Tyrou et al., 1998).

Cette transition repose sur la succession de plusieurs événements épigénétiques qui requièrent la coopération d'une série d'acteurs moléculaires essentiels à l'aboutissement de la spermiogenèse. En première ligne interviennent les facteurs de transcription et enzymes de modification des histones nécessaires à l'expression des nouveaux constituants de la chromatine.

Chez la souris, les protéines de transition ainsi que les protamines sont transcrites dès le stade de spermatide ronde (stade 7). Leurs ARNm sont stockés et ne seront traduits qu'au stade de spermatide allongée (stades 14 à 16) (Steger, 1999)(Morales et al., 1991). La transcription des *Tnp1/2* et *Prm1/2* est prise en charge par le facteur de transcription Crem (*c-AMP response element modulator*), principal effecteur de la voie AMPc (*Adénosine MonoPhosphate Cyclique*), et par son co-activateur l'histone déméthylase Jmjd1a. Les souris invalidées pour les gènes codants *Crem* (Nantel et al., 1996) ou *Jmjd1a* (Okada et al., 2010, Liu et al., 2010) sont stériles et présentent un arrêt de la spermatogenèse au stade de spermatide ronde associé un défaut d'expression des *Prm1/2* et *Tnp1/2*. D'autre part, la double invalidation *Tnp1/Tnp2* se traduit par une infertilité totale liée à des anomalies majeures de la morphologie des spermatozoïdes et à une décondensation partielle de la chromatine (Zhao et al., 2004). De même, les souris hétérozygotes pour l'invalidation des gènes codant *Prm1* ou *Prm2* présentent des défauts de compaction de la chromatine et sont stériles (Cho et al., 2001).

La libération et le remplacement des histones au profit des protamines requièrent une étape préalable de déstabilisation des nucléosomes mettant en jeu plusieurs procédés de remaniements chromatinien (Figure 14).

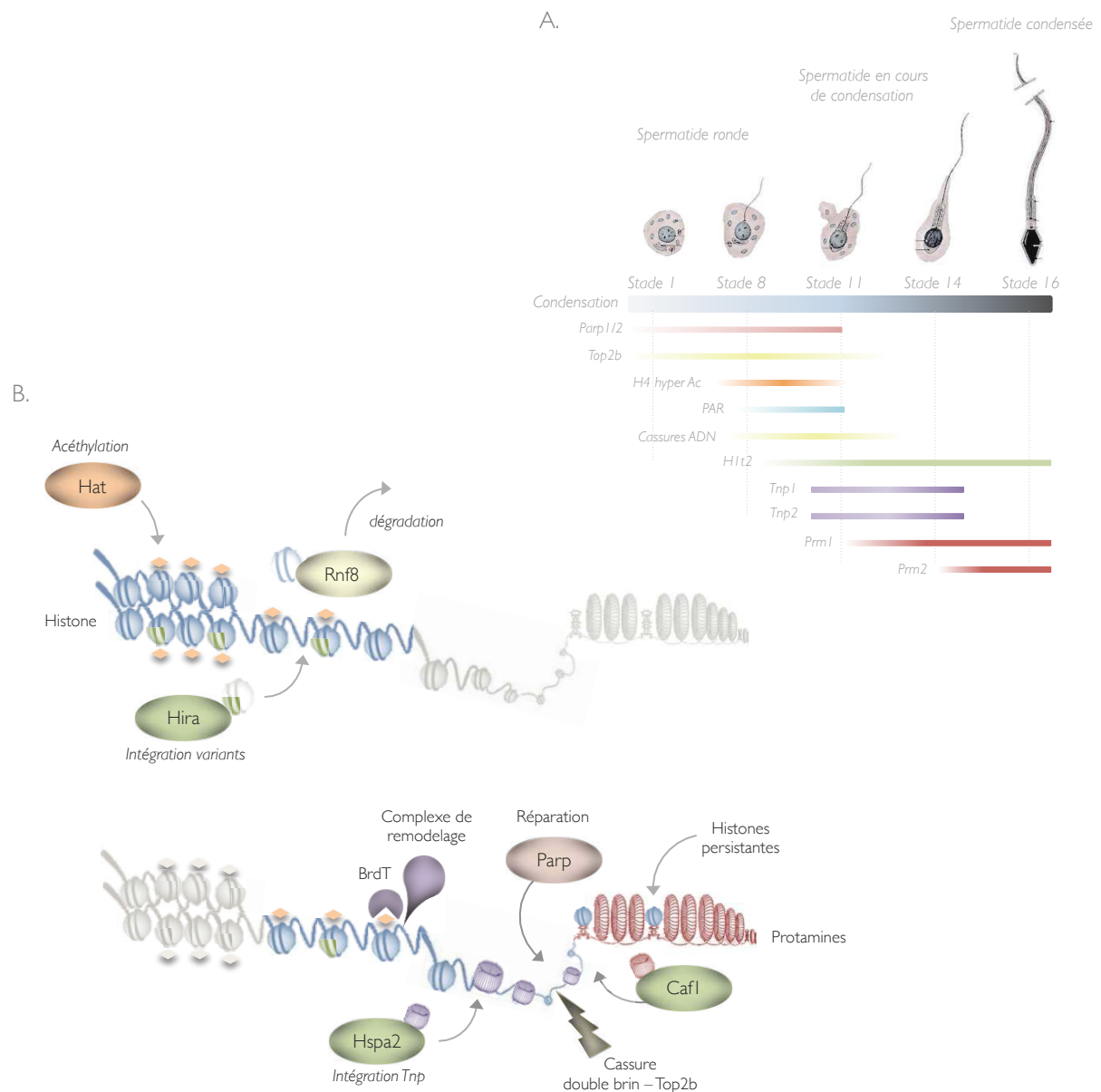


Figure 14. Les mécanismes de régulation de la transition histone-protamine.

La libération et le remplacement des histones au profit des protamines requièrent une étape préalable de déstabilisation des nucléosomes mettant en jeu plusieurs procédés de remaniements chromatiniens. **A**, Représentation schématique de la cinétique d'intervention des acteurs moléculaires participant à la transition histone-protamine. **B**, Les Hat conduisent à l'hyperacétylation des histones H4. Celles-ci acquièrent une charge négative déstabilisant la structure du nucléosome. Cet événement est couplé à l'incorporation de variants d'histones par les chaperonnes Hira. La E3 ubiquitine ligase Rnf8 permet quant à elle l'ubiquitination et le protéolyse des histones H2A et H2B. Les histones hyperacétylées sont reconnues par les protéines BrdT. Elles faciliteront à leur tour le recrutement des complexes de remodelage chromatinien (Swi/Snf) nécessaires à la relaxation de la chromatine. L'intégration des protéines de transition est facilitée par l'intervention des chaperonnes d'histones Hspa2. La Topoisomérase 2b induit des cassures double brins de l'ADN ce qui contribue à diminuer la tension de la double hélice. Cet événement conduit au recrutement de Parp sur les sites de cassures. Par l'ajout de résidus PAR, il favorisera le déstabilisation des nucléosomes et l'intégration des protamines acheminées à la chromatine par les chaperonnes Caf-1. *Modifiée à partir de Rathke et al., 2014.*

Hat, Histone acetyl transferase ; Parp, Poly ADP ribosyl Polymerase ; PAR, Poly ADP rybosyl ; Rnf8, Ring finger protein 8 ; Caf-1, Chromatine Assembly Factor 1 ; Top2b, Topoisomérase 2b ; Prm, Protamine ; Tnp, Protéine de transition ;

i Intégration de variants d'histone

Dès la fin de la méiose, des variants d'histones sont intégrés aux nucléosomes et participent à la fragilisation de leur structure (Godde, 2009). Plusieurs variants sont décrits pour chacune des histones « canoniques » existantes. Dans les cellules germinales, on retrouve principalement les variants des histones H1, H2A, H2B, et H3. Le variant H1t2 est l'un des variants spécifiques au testicule. Son expression est détectée dans les cellules germinales dès la fin de la méiose jusqu'à la fin de la réorganisation chromatinienne. Sa présence est essentielle à la production de spermatozoïdes fonctionnels ; son invalidation conduit chez la souris à des défauts de condensation chromatinienne associée à une tératozoospermie conduisant à une réduction de la fertilité (Tanaka et al., 2005, Martianov et al., 2005).

ii Modifications post-traductionnelles des histones

La transition histone-protamine est marquée par une vague d'hyper-acétylation de l'histone H4 sur quatre de ses résidus lysine : H4K5, H4K8, H4K12 et H4K16 (Grimes and Henderson, 1984, Morinière et al., 2009). Au cours de la spermiogenèse, ce signal d'hyper-acétylation apparaît comme un prérequis à l'intégration des Tnp1/2 et Prm1/2. La diminution des niveaux d'acétylation chez l'homme ou la souris est associée à une infertilité (Sonnack et al., 2002, Fenic et al., 2004). L'histone H4 hyper-acétylée acquiert une charge négative qui favorise sa dissociation de l'ADN dont la charge est également négative. La structure des nucléosomes se relâche et facilite la libération des histones au profit de l'intégration des protéines de transition (Rathke et al., 2007). Outre ce phénomène physique, les résidus acétylés constituent un signal moléculaire permettant le recrutement de protéines nucléaires de type BrdT (*Bromodomain testis-specific protein*), démontrées *in vitro* et *in vivo* chez la souris comme étant impliquée dans le remaniement chromatinien (Pivot-Pajot et al., 2003). Les mécanismes précis de l'action des BrdT pour la transition histone-protamine de la lignée germinale restent à ce jour méconnus. L'intégrité des bromo-domaines des BrdT, domaines de reconnaissance des résidus acétylés (Winston and Allis, 1999), a été montrée comme essentielle à la spermiogenèse et au maintien de la fertilité (Shang et al., 2007, Berkovits and Wolgemuth, 2011). Chez le rat, BrdT interagit avec Smarce1 (*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1*), membre du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf. Leur association est particulièrement élevée au moment de la vague d'hyper-acétylation précédant l'intégration des protéines de transition à la chromatine (Dhar et al., 2012).

D'autres modifications post-traductionnelles participent à la dissociation des nucléosomes (Sheng et al., 2014). La E3 ubiquitine ligase Rnf8 (*Ring finger protein 8*) permet l'ubiquitination et la

protéolyse des histones H2A et H2B par le protéasome. Son activité est essentielle au remaniement des nucléosomes et à la spermatogenèse (Ma et al., 2011).

iii *Chaperonnes d'histones*

L'élimination des histones et l'intégration des nouveaux composants à la chromatine nécessitent l'intervention de mécanismes de remodelage actifs dépendants de l'ATP (Park and Luger, 2008). Ainsi un certain nombre de chaperonnes d'histones sont nécessaires à la spermiogenèse. HspA2 (*Heat shock proteins A2* ou Hsp 70.2) est une chaperonne spécifique du testicule exprimée dans les cellules germinales post-méiotiques où elle interagit avec les protéines de transition (Govin et al., 2006). Son invalidation chez la souris entraîne l'absence de cellules germinales post-méiotiques et une infertilité (Dix et al., 1996). De même, la chaperonne d'histone Caf-1 (*Chromatin assembly factor 1*) est nécessaire à l'intégration des protamines (Doyen et al., 2013). Son activité n'apparaît cependant pas être requise pour la dissociation des histones à la chromatine.

iv *Relaxation de la double hélice d'ADN*

La réorganisation de la chromatine nécessite une étape préalable de relâchement de la double hélice d'ADN. Celle-ci est rendue possible par la génération de cassures doubles brins transitoires catalysée par la Topoisomérase-2-beta (Top2b) (Laberge and Boissonneault, 2005, McPherson and Longo, 1993, Rathke et al., 2007, Smith and Haaf, 1998, Marcon and Boissonneault, 2004). Parfaitement physiologiques, ces dernières entraînent l'activation des protéines Parp1/2 (*Poly ADP ribose polymérase 1 et 2*) (Amé et al., 2004). Recrutées sur les sites de coupures de l'ADN, les Parps catalysent la formation de polymères d'ADP-Ribose ou PAR (Poly(ADP)-Ribose) sur leurs protéines cibles. Celles-ci acquièrent alors une charge négative et se dissocient de l'ADN (Meyer-Ficca et al., 2011). De cette manière Parp1/2 s'auto-inactive et limite l'action de la Top2b. Les variants d'histones H1t et Hils1 sont également « PARylés » (Faraone-Mennella et al., 1999, Kim et al., 2004) et l'invalidation de *Parp1* (souris *Parp1*^{-/-}) ou des approches d'inhibition pharmacologique de son activité entraîne, chez la souris, une rétention anormale des nucléosomes, une décondensation du noyau des spermatozoïdes ainsi qu'une hypofertilité associées à des anomalies de développement de la descendance (Meyer-Ficca et al., 2009, Ihara et al., 2014). Il en est de même lorsque le gène codant *Parg*, enzyme responsable du catabolisme des polymères PAR, est invalidé ou l'activité de la protéine inhibée (Meyer-Ficca et al., 2009, Ihara et al., 2014). Le maintien de l'homéostasie testiculaire de PARylation apparaît ainsi comme crucial pour la production de spermatozoïdes matures et fonctionnels capables de générer une descendance saine.

d) Les histones et le spermatozoïde

Bien que dans le spermatozoïde mature la majorité des histones soit remplacée au profit des protamines, quelques régions de l'ADN restent liées aux nucléosomes. Chez la souris, celles-ci représentent environ 1-4% du génome tandis que chez l'homme près de 5-15% de la chromatine demeure associée aux histones (Wykes and Krawetz, 2003, De Vries et al., 2012).

Les nucléosomes ne sont pas répartis aléatoirement sur le génome du spermatozoïde. On les retrouve particulièrement enrichis au niveau de régions centromériques et télomériques des chromosomes (Zalenskaya et al., 2000) ainsi que sur les séquences d'ADN de type rétrotransposons (LINE1, *Long interspersed elements* et SINE, *Short interspersed elements*) (Pittoggi et al., 1999). La rétention des nucléosomes aurait ainsi pour rôle de signaler ces régions particulièrement sensibles (aussi bien sur le plan structural que fonctionnel) pour que celles-ci soient reconnues et leur chromatine réorganisée au plus tôt après la fécondation.

La présence d'histones a également été mise en évidence sur les séquences promotrices de gènes clefs du développement embryonnaire ou dans les régions régulatrices de gènes à empreintes parentales (Brykczynska et al., 2010)(Gatewood et al., 1987, Hammoud et al., 2010, Arpanahi et al., 2009). Les marques d'histones permissives H3K4me2 et H3K4me3 sont par exemple retrouvées sur le promoteur des gènes homéotiques dont l'expression est cruciale dès les premières phases du développement fœtal. La marque ouverte H3K4me3 est aussi retrouvée sur les séquences régulatrices de gènes à empreinte d'expression allélique paternelle. Sur ces régions particulières, l'encodage des histones permettrait de maintenir la chromatine dans un état décondensé, rapidement accessible à la machinerie transcriptionnelle. A l'opposé, la marque répressive H3K27me3 se trouve enrichie aux promoteurs de gènes dont l'expression, requise pour le développement fœtale, ne doit être initiée que plus tardivement à partir des stades post-implantatoires du développement embryonnaire.

La rétention des histones sur le génome du spermatozoïde et la nature de leurs modifications post-traductionnelles constituent un code épigénétique à part entière nécessaire au bon déroulement du programme transcriptionnel du zygote. Cette notion fait partie intégrante du concept de transmission épigénétique par le gamète au même titre que la méthylation de l'ADN. Aussi, l'altération de la mise en place de ce code dans les cellules germinales peut influencer la qualité du bagage génétique transmis à la descendance. Chez l'homme, des altérations du ratio Protamine1/Protamines2, égal à 1 en conditions physiologiques, sont associées à l'infertilité (Mengual et al., 2003, Torregrosa et al., 2006). De même, des travaux récents ont mis en évidence une rétention anormale des histones globales dans les spermatozoïdes d'hommes stériles (Hammoud et al., 2011). Celle-ci est associée à une altération des niveaux des marques H3K4me2/3 ou H3K27me3 sur le promoteur de gènes

spécifiques : gènes développementaux ou gènes à empreinte parentale. Ces mêmes régions présentent par ailleurs des profils anormaux de méthylation de l'ADN (Hammoud et al., 2011), tels que ceux qui avaient pu être observés au préalable dans le cadre d'études menées à partir de sperme de patients atteints de troubles de la fertilité (Kobayashi et al., 2007, Marques et al., 2004, Poplinski et al., 2010, Boissonnas et al., 2010).

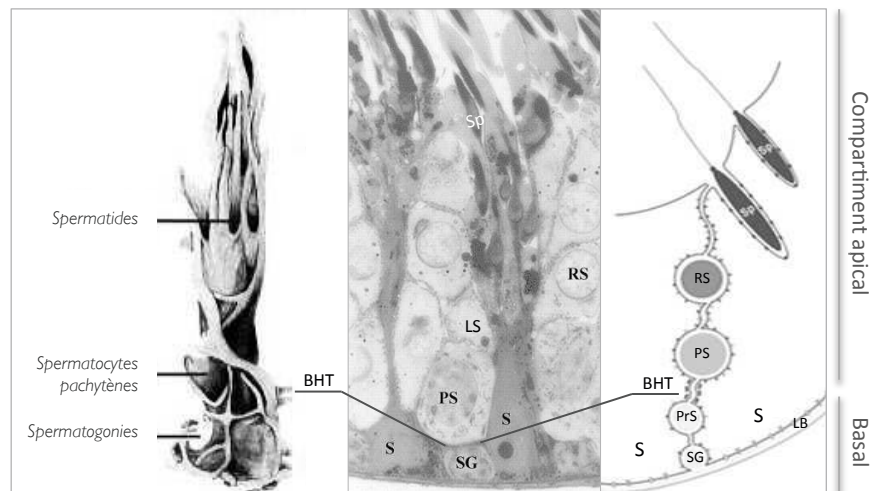


Figure 15. La cellule de Sertoli, support structural et nutritif de la lignée germinale.

Les cellules de Sertoli dessinent un échafaudage pouvant accueillir de 30 à 50 cellules germinales à des stades de maturation différents. Le contact entre les faces baso-latérales des cellules de Sertoli (S) forme la barrière hémato-testiculaire (BHT) et divise l'épithélium séminifère en deux compartiments : l'un basal, comportant les spermatogonies (SG) et les spermatocytes pré-leptotènes (PrS), l'autre apical contenant les stades spermatocytes pachytènes (PS) et les stades spermatides rondes (rSp) puis allongées (Sp). Lamé basale (LB). Lumière séminale (L).

(Gauche) Représentation schématique de la surface d'une cellule de Sertoli de rat. *Modifiée à partir de Hess & França, 2005* ; (Centre) Image de microscopie électronique de l'épithélium séminifère de souris ; (Droite) Représentation schématique de la structure de l'épithélium séminifère. *Modifiée d'après Mruk and Cheng, 2004.*

2. La cellule de Sertoli

En relation étroite avec les cellules germinales tout au long de leur différenciation, elle en assure le soutien architectural et nutritif (Griswold, 1998). L'ensemble de son activité est régulé par l'axe hypothalamo-hypophysaire *via* la FSH, la testostérone, mais également localement par les signaux juxtacrines et paracrines émis par la lignée germinale. Un certains nombres de composés autocrines permettent également à la cellule de Sertoli de réguler sa propre activité.

2.1. Fonctions

2.1.1. *Rôle architectural*

Etendue sur toute l'épaisseur de l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli dessine un échafaudage pouvant accueillir de 30 à 50 cellules germinales à des stades de maturation différents (Figure 15) (Weber et al., 1983). Les cellules de Sertoli constituent ainsi une plateforme assurant, au travers d'un réseau complexe de jonctions intercellulaires ancrées à son cytosquelette, la cohésion de l'épithélium séminifère et la progression des cellules germinales tout au long de leur différenciation (pour revue Mruk and Cheng, 2004). La cellule de Sertoli est également à l'origine de la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire (Collagène, Laminine), ciment de l'épithélium dans lequel évoluent les cellules germinales (Skinner et al., 1985). Cette proximité cellulaire garantit l'accès des cellules germinales aux nutriments, facteurs de croissances et autres acteurs paracrines sécrétés par la cellule de Sertoli ; ces derniers guideront l'avancée des cellules germinales dans le processus de différenciation.

Chaque cellule de Sertoli est également au contact d'une demi-dizaine d'autres cellules de Sertoli. Ces interactions cellulaires forment au tiers inférieur du tube séminifère une frontière semi-perméable, la barrière hémato-testiculaire (BHT). La BHT s'établit au moment de la puberté sous l'effet des androgènes et des rétinoïdes (De Gendt and Verhoeven, 2012, Sharpe et al., 2003, Tarulli et al., 2012). Elle sépare alors physiquement et fonctionnellement l'épithélium en deux compartiments. Les spermatogonies ainsi que les spermatocytes I pré-leptotènes sont localisés dans le compartiment basal tandis que les stades de différenciation plus avancés sont localisés dans le compartiment apical (Dym and Cavicchia, 1978). La BHT permet la constitution d'un microenvironnement spécialisé indispensable à la survie des cellules germinales en cours de différenciation (Pelletier and Byers, 1992) : 1 - La BHT porte la fonction de filtre moléculaire et restreint le passage de molécules à taille réduite vers le compartiment luminal du tube séminifère. Elle facilite la diffusion de la testostérone et permet, à l'inverse, de protéger les cellules germinales haploïdes de l'exposition à des substances toxiques telles que les xénobiotiques (Okumura et al., 1975) ; 2 - La BHT délimite un environnement de privilège immunitaire nécessaire à la spermatogenèse. Elle permet d'isoler les cellules post-

Type de jonction	Localisation	Composants protéiques
Jonction serrée		
Jonction serrée	relie de manière étroite les membranes de deux cellules de Sertoli adjacentes (BHT)	<i>Protéines transmembranaires</i> : Occludine, Claudine, Jam-A, Jam-B <i>Protéines adaptatrices</i> : Zo-1, Zo-2, Actine, Collagène <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : FAK, c-src, c-yes, p38-Mapks, Erk1/2, Jnk, Dynamine 2
Jonctions adhérentes		
Hémidesmosome	relie le cytosquelette (filaments intermédiaires) de la cellule de la Sertoli à la lame basale	<i>Protéines transmembranaires</i> : Laminine α 2, β 1-Integrine <i>Protéines adaptatrices d'ancrage</i> : Paxilline
Desmosome	relie le cytosquelette (actine) de la cellule de Sertoli à celui des cellules germinales (sauf durant spermiogénèse), et les cytosquelettes (actine) de deux cellules de Sertoli adjacentes (BHT)	<i>Protéines transmembranaires</i> : Desmoglein2, Desmocolline2/3 <i>Protéines adaptatrices d'ancrage</i> : Plakoglobine, Plakophiline, Desmoplakine, Vimentine <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : c-src
Spécialisation ectoplasmique basale	relie les cytosquelettes (actine) de deux cellules de Sertoli adjacentes (BHT)	<i>Protéines transmembranaires</i> : N-Cadhérine, Nectine-2 <i>Protéines adaptatrices d'ancrage</i> : β -Caténine, α -Caténine, γ -Caténine, Afadine <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : Dynamine, c-src, c-yes, Esp8
Spécialisation ectoplasmique apicale	relie le cytosquelette (actine) de la cellule de Sertoli à celui des spermatides (stade 8-19)	<i>Protéines transmembranaires</i> : α 6 β 1-Integrine, Laminine- α 3, Laminine- β 3, Laminine- γ 3, N-Cadhérine, E-Cadhérine, Nectine-2, Nectine-3, Car, Jam-B, Jam-C <i>Protéines adaptatrices d'ancrage</i> : Caténines, Afadine, Espine, Fimbrine, p120, Vinculine, Paxilline, Axine, Collagène, Actine, N-Wasp... <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : Fak, c-src, c-yes, Esp8, Pten, Dynamine1/2, fragments de Laminine
TBC	basal : produit de dégradation de ES basales (BHT) apical : produit de dégradation de ES apicales	<i>Protéines transmembranaires et protéines adaptatrices d'ancrage</i> : respectivement identiques aux ES basales et apicales <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : Actine, Clathrine, Cofiline, Arp2/3, Esp8, Dynamine, N-Wasp, c-yes, c-src...
Jonction communicante		
Jonction communicante	relie par un canal les cellule de Sertoli au cellules germinales (sauf spermiogénèse) et les cytosquelettes de deux cellules de Sertoli adjacentes (BHT)	<i>Protéines transmembranaires</i> : Connexine43, Connexine33... <i>Protéines adaptatrices</i> : Plakophiline, β -caténine <i>Protéines adaptatrices de signalisation</i> : c-src

Figure 16. Tableau récapitulatif des principaux composants protéiques des différents types de jonctions intercellulaires de l'épithélium séminifère.

L'épithélium séminifère est composé d'un assortiment de trois types de jonctions épithéliales : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes. Toutes présentent une architecture similaire : une protéine transmembranaire est associée à des protéines intracytoplasmiques dites adaptatrices. Certaines permettent l'ancrage des complexes de jonctions au cytosquelette. D'autre jouent le rôle de molécule de signalisation.

Jam, *Junctional adhesion molecules* ; Zo, *Zonula occludens* ; Fak, *Focal adhesion kinase* ; p38Mapks, *Mitogen-activated protein kinases* ; Erk, *Extracellular signal-regulated kinases* ; Jnk, *c-Jun N-terminal kinase* ; N-Wasp N- *Wiskott-Aldrich syndrome family protein* ; Esp8, *Exocrine gland secreted peptide 8* ; Pten, *Phosphatase and TENsin homolog* ; Arp2/3, *Actin related protein 2/actin related protein 3* ; BHT, barrière hémato testiculaire. Modifié à partir de Mruck et Cheng, 2004.

méiotiques et les nombreux antigènes présents à leur surface de la circulation systémique et prévient ainsi l'entrée des immunoglobulines ou des lymphocytes dans le compartiment luminal de l'épithélium (Fijak et al., 2011) ; 3 - La BHT sépare les cellules de Sertoli elles mêmes en deux pôles, basal et apical, respectivement au contact des compartiments basal et luminal de l'épithélium séminifère. La cellule de Sertoli acquière ainsi une sécrétion dite polarisée. Cette configuration permet la distribution et la diffusion de molécules dans un compartiment choisi.

a) Géographie des jonctions intercellulaires de l'épithélium séminifère

L'architecture de l'épithélium séminifère est constituée d'un réseau complexe de jonctions intercellulaires qui unissent les cellules germinales entre elles, les cellules germinales aux cellules de Sertoli et les cellules de Sertoli entre elles pour constituer la BHT (Mruk and Cheng, 2004, Russell and Peterson, 1985). On distingue classiquement trois types de jonctions épithéliales : les jonctions serrées, les jonctions communicantes, et les jonctions adhérentes. Toutes présentent une architecture similaire faisant intervenir plusieurs constituants protéiques (Figure 16) (Tsukita et al., 2001, Perez-Moreno et al., 2003, Dermietzel et al., 1990). Une protéine transmembranaire est associée à des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Certaines possèdent une activité de molécule de signalisation ; elles sont impliquées dans la régulation de la dynamique des complexes de jonction et dans de nombreuses fonctions cellulaires (différenciation, prolifération). D'autres jouent le rôle d'intermédiaires pour ancrer l'ensemble de la structure au cytosquelette (actine ou filaments intermédiaires).

Contrairement à d'autres épithéliums où la distribution des différents types de jonctions intercellulaires est clairement régionalisée, elles sont, dans le tube séminifère, entrecroisées et interagissent aussi bien physiquement que fonctionnellement pour assurer la progression de la spermatogenèse (Figure 17).

i Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont concentrées au tiers inférieur de l'épithélium séminifère, au niveau de la BHT. Elles associent de manière étroite les membranes de 2 cellules de Sertoli adjacentes et forment au côté des jonctions communicantes et des jonctions adhérentes (spécialisations ectoplasmiques basales, desmosomes, complexe tubulobulbaire) une plateforme de jonctions intercellulaires synchronisées dont la dynamique d'ouverture et fermeture permet la progression des spermatocytes pré-leptotènes dans le compartiment apical lors de la phase méiotique (Pelletier and Byers, 1992, Wong and Cheng, 2005, Lui et al., 2003b, Russell, 1977b).

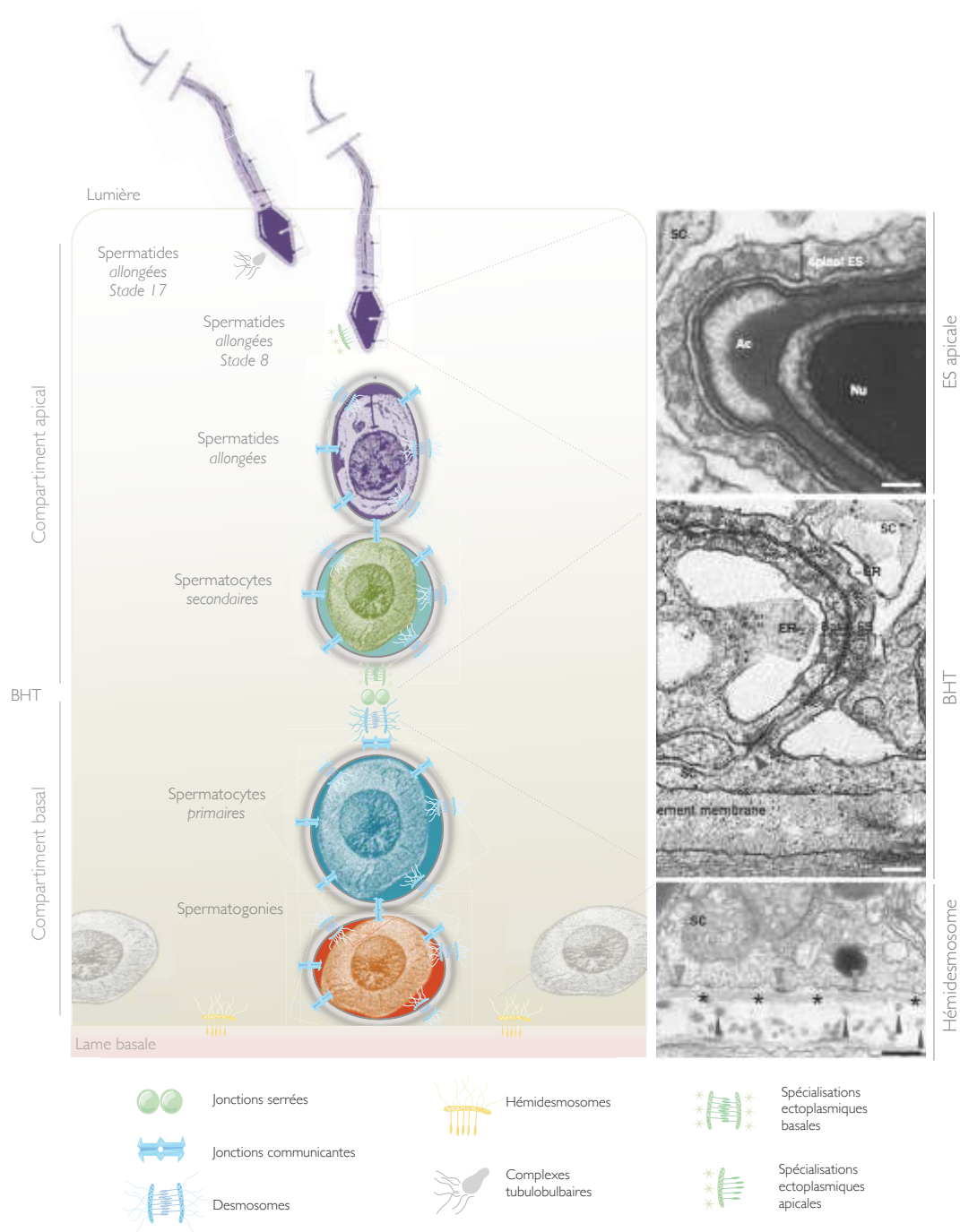


Figure 17. Représentation schématique de la géographie des jonctions intercellulaires de l'épithélium séminifère.

Les hémidesmosomes ancrent les cellules de Sertoli à la lame basale. Au tiers inférieur de l'épithélium séminifère, les complexes de jonctions de la BHT (jonctions serrées, jonctions communicantes, spécialisations ectoplasmiques basales et desmosomes) associent de manière étroite les membranes de 2 cellules de Sertoli adjacentes. Cette structure divise l'épithélium en deux compartiments : l'un basal, l'autre apical. Les jonctions adhérentes de type desmosomes accompagnent les cellules germinales tout au long de leur parcours à la surface des cellules de Sertoli. Elles laissent place aux spécialisations ectoplasmiques apicales lors des stades d'élongation des spermatides. Quelques heures avant la spermiation les complexes tubulobulbaires facilitent l'internalisation des complexes de jonctions et la libération des spermatozoïdes dans la lumière du tube séminifère. Les jonctions communicantes sont retrouvées sur toute l'épaisseur de l'épithélium. Elles relient les cellules germinales aux cellules de Sertoli, et les cellules germinales entre elles, pour permettre l'échange de substances nécessaires à la synchronisation de la physiologie des différents types cellulaires. (*Gauche*) Représentation schématique de la répartition des jonctions intercellulaires de l'épithélium séminifère. (*Droite*) Images de microscopies électroniques illustrant de bas en haut : les hémidesmosomes, les complexes de jonction de la BHT, les jonctions ectoplasmiques apicales.

BHT, barrière hémato-testiculaire

ii Les jonction adhérentes

Les jonctions adhérentes sont distribuées sur toute l'épaisseur de l'épithélium séminifère (Mruk and Cheng, 2004). Elles relient directement le cytosquelette des cellules de Sertoli à 2 types de structures (Tsukita et al., 2001).

- *Cytosquelette à la matrice extracellulaire*

Les jonctions adhérentes reliant le cytosquelette d'une cellule à la matrice extracellulaire qui l'entoure sont les jonctions focales et les hémidesmosomes. Dans le testicule, les hémidesmosomes sont retrouvés uniquement dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère. Ils permettent l'ancrage du pôle basal des cellules de Sertoli à la membrane basale du tube séminifère, considérée dans ce cas précis comme une matrice extracellulaire spécialisée (Russell and Peterson, 1985).

- *Cytosquelette d'une cellule au cytosquelette de la cellule voisine*

Les jonctions adhérentes reliant le cytosquelette d'une cellule au cytosquelette de la cellule voisine (Sertoli ou cellules germinales) sont les jonctions adhérentes de type desmosomes, spécialisations ectoplasmiques et complexe tubulobulbaire.

Les jonctions adhérentes de type desmosomes accompagnent les cellules germinales tout au long de leur parcours à la surface des cellules de Sertoli (Lie et al., 2011). On les retrouve entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies, spermatocytes et spermatides rondes. Lors de la spermiogenèse, les desmosomes laissent place à des jonctions adhérentes particulières au testicule : les spécialisations ectoplasmiques apicales (Russell, 1977c).

Jonctions adhérentes spécifiques à l'épithélium séminifère, les spécialisations ectoplasmiques (ES, *Ectoplasmic specialization*) sont ancrées dans le cytoplasme des cellules de Sertoli à des filaments d'actine hautement organisés leur conférant une structure particulièrement rigide (Grove and Vogl, 1989). Ces derniers forment une architecture hexagonale enchâssée entre le réticulum endoplasmique et la membrane cytoplasmique des cellules de Sertoli. Les ES sont présentes à deux niveaux :

Les ES basales sont retrouvées à la jonction entre deux cellules de Sertoli au niveau de la BHT (Pelletier and Byers, 1992). Elles forment une structure symétrique de part et d'autre du site de contact et sont étroitement associées aux jonctions serrées. Leur intégrité est essentielle à la dynamique d'ouverture/fermeture de la BHT.

Les ES apicales sont situées entre les cellules de Sertoli et les spermatides en cours d'élongation (Wong et al., 2008). Le site d'ancrage à l'actine est ici asymétrique car présent uniquement au sein des cellules de Sertoli. Les ES apicales associent des complexes transmembranaires d'origines diverses: certains sont similaires à ceux retrouvés aux jonctions adhérentes « classiques » (Cadhérine-Caténine, Nectine-Afadin) (Mulholland et al., 2001), d'autres appartiennent au complexe laminine-intégrine retrouvé habituellement dans le cadre des jonctions focales. Dans ce cas particulier, le complexe Laminin-(333)/ $\alpha 6 \beta 1$ -Intégrine contribue à la jonction entre deux types cellulaires ; les intégrines sertoliennes ne sont plus au contact des composants de la matrice extracellulaire mais sont enchâssées dans la membrane des spermatides en cours d'élongation (Koch et al., 1999, Yan and Cheng, 2006). Les ES apicales apparaissent au stade 8 de la spermiogenèse lorsque les jonctions de type desmosomes disparaissent (Russell, 1977c). Les spermatides sont alors orientées la tête enchâssée dans les cryptes de la cellule de Sertoli et la queue libre dans la lumière des tubes séminifères. Cette polarisation des spermatides, attribuée à la présence des ES apicales, est un prérequis au bon déroulement de l'étape de spermiation durant laquelle ces mêmes ES seront déstructurées pour permettre la libération des spermatozoïdes testiculaires dans le fluide séminifère (Romrell and Ross, 1979, O'Donnell et al., 2011). La disparition des ES est alors couplée à l'apparition d'un autre type de jonction spécifique : le complexe tubulobulbaire (Upadhyay et al., 2012).

Le complexe tubulobulbaire (TBC) est une large vésicule pénétrant dans le cytoplasme des cellules de Sertoli (Russell and Clermont, 1976, Russell and Malone, 1980). Sa structure est marquée par la présence de bourgeons composés de multiples complexes de protéines de jonctions ; elle est entourée d'un réseau dense de filaments d'actine ancrés dans le réticulum endoplasmique tels que le sont les jonctions de type ES. Le complexe est associé à de nombreuses protéines de remaniement du cytosquelette (Arp2/3, *Actin-related proteins 2/3* ; Eps8, *Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8*) ainsi qu'à des protéines de type dynamine permettant la fusion du TBC avec les vésicules d'endocytose (Vaid et al., 2007). Les TBC permettraient d'internaliser et de recycler les constituants des complexes de jonctions intercellulaires au cours de deux étapes clés de la dynamique de l'épithélium séminifère. Les TBC présent en basal participent à la dynamique de structuration-déstructuration des complexes de jonction de la BHT (Russell, 1979, Du et al., 2013). En apical, l'apparition des TBC coïncide avec la disparition des ES (O'Donnell et al., 2011) ; ils sont alors retrouvés quelques heures avant la spermiation uniquement sur la face concave de la tête des spermatides allongées au contact de la cellule de Sertoli (Upadhyay et al., 2012).

iii Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes sont réparties tout au long de l'interface entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales, et entre les Sertoli elles-mêmes où elles sont associées aux multiples jonctions structurant la BHT (Pointis and Segretain, 2005, Li et al., 2012). Elles permettent l'union de deux cellules adjacentes par de petits canaux tubulaires formés par l'aboutement de 2 hémicanaux ou connexons (Oshima, 2014). Chaque connexon est constitué de 6 protéines transmembranaires, les connexines (Cx), liées les unes aux autres pour former un pore hydrophile. Les jonctions communicantes permettent le passage direct de petites molécules dont le poids moléculaire peut atteindre jusqu'à 1500 daltons (Bruzzzone et al., 1996, Kumar and Gilula, 1996). Parmi elles, on retrouve essentiellement des acides aminés, des électrolytes (Ca^{2+} , K^+ , Cl^-) ainsi que des messagers secondaires comme l'AMPc ou l'Inositol-tri-Phosphate (IP3). Ces échanges intercellulaires permettent la synchronisation de la physiologie des différents types cellulaires qui entrent dans la composition de l'épithélium séminifère (activité métabolique, prolifération, apoptose, différenciation) ; on parle de couplage ionique (électrique) et biochimique (ou métabolique). Associée à un défaut de contrôle de la prolifération cellulaire, la perte d'expression des Cx est également considérée comme l'un des événements initiateurs du développement tumoral (Roger et al., 2004). Chez les rongeurs, 11 membres des Cx sont exprimés dans le testicule à l'âge adulte : Cx 26, 30.2, 31, 31.1, 32, 33, 37, 40, 43, 46 et 50 (Risley, 2000). Parmi eux, la Cx43, ou Gja1 (*Gap Junction protein Alpha 1*) joue un rôle central pour le maintien de l'intégrité de l'ensemble des jonctions intercellulaires structurant l'épithélium séminifère (Li et al., 2010, Weider et al., 2011, Carette et al., 2010, Lee et al., 2007).

b) Dynamique et régulation des jonctions épithéliales

Au fur et à mesure de l'avancement dans le cycle de l'épithélium séminifère, la cellule de Sertoli va adapter sa morphologie afin d'optimiser le contact avec les cellules germinales et permettre leur mouvement (Xiao et al., 2014). La restructuration des jonctions intercellulaires composant la BHT permet le passage des spermatocytes pré-leptotènes, tandis qu'à l'interface entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales le remaniement des jonctions permet la progression des spermatides jusqu'au pôle apical. Enfin, lors de la spermiation, les complexes protéiques qui unissent les spermatides aux cellules de Sertoli sont rompus pour permettre la libération des spermatozoïdes testiculaires dans la lumière des tubes séminifères.

Ces événements sont synchronisés à la surface des cellules de Sertoli ; l'action coordonnée de multiples facteurs d'origine endocrine, paracrine et autocrine (Cheng et al., 2010, Cheng and Mruk, 2010, Lie et al., 2013) permet de réguler au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, et post-traductionnel (ubiquitination – endocytose) les constituants des divers complexes de jonctions (Lui

and Lee, 2006). Tandis que la testostérone ou la FSH favorisent la stabilité des jonctions intercellulaires, l'action des cytokines conduit à leur déstabilisation (Lui and Lee, 2009, Li et al., 2009, Cheng et al., 2010). Tous les trois agissent ainsi de manière complémentaire et synchronisée pour la régulation de la dynamique de l'épithélium séminifère. Dans les cellules de Sertoli les concentrations de calcium intracellulaire ou du messenger secondaire AMPc ont été démontrées comme impliquées dans le contrôle de l'intégrité des complexes de jonctions (Janecki et al., 1991). Enfin, les phénomènes d'endocytose-transcytose et recyclage des constituants membranaires sont facilités par l'intervention d'acteurs du remaniement du cytosquelette de la cellule de Sertoli. Tandis qu'Eps8 permet de maintenir l'organisation des réseaux d'actine et de stabiliser l'ancrage des complexes de jonction (Lie et al., 2009a), Arp3 joue le rôle inverse (Lie et al., 2010) ; il interviendrait ainsi dans la formation des TBC basaux et apicaux lors des événements d'ouverture de la BHT et de spermiation (Mruk and Cheng, 2004b)(Cheng and Mruk, 2011). Son action est soutenue par l'intervention des métalloprotéases Mmp-2 et Mmp-9 (*Matrix metalloproteinases 2 et 9*); ces dernières permettront la déstabilisation du réseau de collagène et le clivage des jonctions adhérentes de type Laminine/Intégrine présentent respectivement au sein des jonctions spécialisées basales et apicales (Siu et al., 2003, Yao et al., 2010, Lydka et al., 2012). L'action des Mmp sera par ailleurs contrôlée et limitée sous l'effet d'inhibiteurs de protéases tels que Timp1 (*Tissue inhibitor of metalloprotease 1*) (Mruk et al., 2003).

c) Exemple du dialogue autocrine laminine-intégrine

Pour permettre le maintien de l'homéostasie cellulaire au sein de l'épithélium séminifère et assurer la continuité des cycles de spermatogenèse, l'entrée des spermatocytes en phase méiotique et la libération de spermatozoïdes doivent être strictement synchronisées ; plusieurs travaux ont montré que les événements d'ouverture transitoire de la BHT et de spermiation font l'objet de co-régulations (Lie et al., 2009b, Yan et al., 2008a, Cheng and Mruk, 2011). Au cours de la spermiation, la métalloprotéase Mmp-2 permet le clivage des complexes d'adhésion Laminine-(333)/ $\alpha 6 \beta 1$ -Intégrine et le désengagement des spécialisations ectoplasmiques apicales (Siu and Cheng, 2004). Cette étape, en plus de permettre la libération des cellules germinales matures, conduit à la génération de fragments biologiquement actifs de Laminine-(333). Ces derniers, phagocytés par la cellule de Sertoli, seront responsables de la diminution des niveaux d'accumulation de l'Occludine (jonction serrée) ou de la protéine adaptatrice Zo-1 (*Zona Occludens-1*) au sein des complexes de jonction de la BHT (Yan et al., 2008a). Les fragments de Laminine-(333) participent également à la répression des niveaux de $\beta 1$ -Intégrine au niveau des hémidesmosomes (Sertoli-membrane basale) ce qui affecte indirectement l'intégrité de la BHT (Yan et al., 2008a, Wong et al., 2008). Le traitement de cultures cellulaires de Sertoli isolées à partir de rat par des doses croissantes de fragments de Laminines recombinants

(Laminine β_3 et/ou γ_3) conduit à la diminution de l'accumulation des protéines des jonctions serrées $\beta 1$ -Intégrine, Occludine et Zo-1. Cette boucle d'autorégulation permise par les constituants des complexes de jonctions eux-mêmes est un exemple de système de régulation autocrine qui permettra l'entrée dans le compartiment apical d'une nouvelle vague de spermatocytes en réponse à la libération des spermatides.

d) Interactions structurales et fonctionnelles des jonctions épithéliales

Comme évoqué précédemment, le maintien de la structure de l'épithélium est assuré par un assemblage de différents types de jonctions intercellulaires qui interagissent aussi bien sur le plan fonctionnel que structural. Cette notion est particulièrement vraie au niveau de la BHT où jonctions adhérentes, serrées et communicantes s'associent et font l'objet d'une dynamique commune pour ne constituer qu'une seule et même plateforme d'interactions cellulaires. Bien que les protéines transmembranaires telles que l'Occludine ou les Cadhérines ne soient pas reliées directement entre elles, ces dernières interagissent avec un réseau commun de protéines adaptatrices. Au niveau de la BHT, la protéine adaptatrice Zo-1 relie par exemple les complexes membranaires des jonctions adhérentes et serrées à un même réseau d'actine. La Cx 43, constituant des jonctions communicantes, a été décrite comme étant associée aux protéines des jonctions serrées (Zo-1, Zo-2) et adhérentes (N-Cadhérine, α -Caténine, β -Caténine ou p120) (Toyofuku et al., 1998).

Cette interaction étroite implique que le dysfonctionnement de l'un des constituants d'une jonction particulière pourra influencer la stabilité des jonctions voisines. Plusieurs modèles *in vivo* ont été développés ces dernières années afin de mieux comprendre les liens fonctionnels existant entre les différents types de jonctions. Certains conduisent à la perte définitive du contenu cellulaire de l'épithélium séminifère associée au défaut de production de gamètes et à une stérilité. Chez le rat l'injection intra-testiculaire de peptide bloquant la fonction des connexines (peptide « pan Connexine »), entraîne la perte progressive de l'épithélium séminifère (Lee et al., 2006). Celle-ci est entre autre associée à une mauvaise localisation de la N-Cadhérine ainsi qu'à la diminution de l'accumulation de l'Occludine (Lee et al., 2006). Chez le rat, l'administration de cadmium conduit à la délocalisation de l'Occludine et son adaptateur Zo-1 à la barrière (Siu et al., 2009). Ce phénomène est couplé à la perte des complexes d'adhésion de type Cadhérine/Caténine. Il est à noter que le cadmium fait partie des agents toxiques de la famille des métaux lourds retrouvés dans l'eau de boisson ou les aliments. Une exposition chronique pourrait ainsi être chez l'homme à l'origine d'infertilité telle qu'observée chez l'animal. De plus, de multiples agents toxiques (DTT, pentachlorophénol, dieldrin, dinitrobenzène, *cadmium chloride*, cisplatine, gossypol, bisphénol A et *tert*-octylphénol) ont été démontrés *in vitro* comme affectant la localisation et/ou les niveaux d'accumulation des protéines de

jonctions telles que l'Occludine, Zo-1, N-Cadhérine et particulièrement Cx43 qui pourrait en être la cible initiale. Chez l'homme, l'exposition à ces agents toxiques pourrait de la même manière conduire à l'altération de l'intégrité de l'épithélium séminifère et à l'arrêt de la spermatogenèse. Chez des patients atteints d'infertilité, la diminution de l'accumulation des transcrits *CX43* est corrélée au degré du défaut de spermatogenèse et pourrait être l'un des événements initiateur du développement de tumeurs testiculaires (Chevallier et al., 2013).

2.1.2. La Sertoli : cellule sécrétrice

Maintenues au contact des cellules germinales tout au long de leur différenciation, les cellules de Sertoli fournissent nutriments, protéines, hormones et facteurs de croissance essentiels au déroulement de la gamétogenèse (Jegou et al., 1995). Elles sont également à l'origine de la production du fluide séminifère qui permet la progression des spermatozoïdes testiculaires dans la lumière des tubes séminifères (Russell et al., 1989, Rato et al., 2010).

En résonnance avec leur rôle structural, les cellules de Sertoli sont à l'origine de la sécrétion des composants de la matrice extracellulaire (collagène, laminine), site d'ancrage des jonctions intercellulaires et ciment de l'épithélium séminifère (Skinner et al., 1985). De plus, les cellules de Sertoli produisent et contrôlent la diffusion de protéases (métalloprotéases) et anti-protéases intervenant dans la dynamique des complexes de jonctions. Elles permettent ainsi la progression des cellules germinales au sein de l'épithélium et le relargage des spermatozoïdes lors de la spermiation (Mruk et al., 2003).

La cellule de Sertoli possède une sécrétion polarisée. En amont de la BHT, dans le compartiment basal de l'épithélium séminifère, la sécrétion des facteurs paracrines Scf (*Stem cell Factor* ou *c-kit ligand*) (Rossi et al., 2000) et Gdnf (*Glial-cell-line-derived neurotrophic factor*) (Lamberti and Vicini, 2014) favorisent la prolifération et la survie des spermatogonies et participent au maintien de leur état indifférencié. A l'inverse, Igf-I, Igf-II ou Tgf- α (*transforming growth factor-alpha*) favorisent *in vitro* la différenciation des spermatogonies en spermatocytes (Nakayama et al., 1999, Tajima et al., 1995). Dans le compartiment apical, la sécrétion de multiples protéines de transport permet l'acheminement, à travers la BHT, des ions métalliques (Transferrine, Céruloplasmine) (Sylvester et al., 1994), lipides (Clusterine, Saposine) (Law et al., 1994) ou hormones (Protéine de liaison aux androgènes, Protéine de liaison aux rétinoïdes) (Porter et al., 1985) nécessaires au métabolisme et à la différenciation des cellules germinales post-méiotiques. La cellule de Sertoli prend également en charge l'approvisionnement du compartiment apical en lactate (Robinson and Fritz, 1981), substrat préférentiel nécessaire au soutien du métabolisme des cellules germinales post méiotiques (Jutte et al., 1981, Mita and Hall, 1982, Nakamura et al., 1984). Le

glucose circulant est capté par la cellule de Sertoli par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques de type Glut (*Glucose Transporter*), puis convertit en pyruvate après glycolyse (Angulo et al., 1998). Sous l'action de la lactate déshydrogénase (Ldh), le pyruvate est à son tour convertit en lactate (Rato et al., 2012a) ; son acheminement jusqu'aux cellules germinales sera pris en charge par les transporteurs Mct (*MonoCarboxylate Transporters*)(Oliveira et al., 2011, Rato et al., 2012b).

2.1.3. Activité de phagocytose

En conditions physiologiques, l'apoptose de la lignée germinale intervient de manière fréquente durant la spermatogenèse (Xiong et al., 2009). Elle contribue au maintien de l'homéostasie de l'épithélium séminifère et permet d'assurer un ratio optimal entre le nombre de cellules germinales et le nombre de cellules de Sertoli pour une spermatogenèse efficace (Billig et al., 1995, Print and Loveland, 2000). Elle participe également à l'élimination des cellules germinales présentant des anomalies de réarrangement durant la méiose (Blanco-Rodriguez et al., 2003, Rodriguez et al., 1997). Dans ce contexte, la cellule de Sertoli porte une fonction de phagocytose essentielle à l'élimination des cellules germinales dégénérées. Elle permet de la même manière l'élimination de l'excès de cytoplasme (corps résiduels) durant la spermiogenèse (Kerr and de Kretser, 1974, Blanco-Rodríguez and Martínez-García, 1999, Yefimova et al., 2008).

Les mécanismes exacts mis en jeu dans le processus de phagocytose de la cellule de Sertoli restent à ce jour méconnus. Les travaux d'Elliott montrent que le récepteur Bail, affiché à la membrane des cellules de Sertoli, est impliqué dans la reconnaissance des résidus lipidiques Phosphatidyl-sérine (PtdSer) externalisés à la surface des cellules germinales lors du processus apoptotique ainsi qu'à la membrane externe des corps résiduels au cours de la spermiogenèse (Blanco-Rodríguez and Martínez-García, 1999). Ceci entraîne alors l'activation de Elmo1 (*Engulfment and cell motility 1*), acteur moléculaire impliqué dans le réarrangement du cytosquelette d'actine nécessaire à l'internalisation des corps phagocytés (Elliott et al., 2010).

La majorité des constituants cellulaires issus de la phagocytose des cellules apoptotiques ainsi que de ceux des corps résiduel seront recyclés et contribueront à l'entretien des prochains cycles de spermatogenèse. Les lipides membranaires fourniront l'énergie nécessaire au métabolisme propre à la cellule de Sertoli (Xiong et al., 2009). Les fragments des protéines de jonctions générés lors de la spermiation contribuent à un mode de signalisation autocrine permettant l'ouverture de la BHT et l'entrée des spermatocytes en méiose (Cheng and Mruk, 2010). D'autre part la phagocytose du corps résiduel stimule la production de l'Interleukine-1 (Il-1) et de l'Activine-A (Gérard et al., 1992, Okuma et al., 2006), facteurs paracrines responsables de la progression des spermatogonies en spermatocytes (Mather and Krummen, 1992, Pöllänen et al., 1989).

2.2. Contrôle des fonctions sertoliennes

2.2.1. Contrôle endocrine

a) La Fsh

La Fsh est le régulateur endocrinien majeur des fonctions sertoliennes. C'est une glycoprotéine appartenant à la famille des gonadostimulines ; sa sécrétion par l'hypophyse est sous le contrôle de la GnRh hypothalamique (Padmanabhan and McNeilly, 2001). Au niveau testiculaire, la Fsh exerce son action au contact des cellules de Sertoli par l'intermédiaire de son récepteur spécifique : le récepteur Fsh (Fshr). Ce dernier appartient à la famille des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (Gromoll et al., 1996). Son activation par la Fsh entraîne l'augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc à l'origine de l'induction de multiples acteurs et voies de signalisation cellulaires (Lalli and Sassone-Corsi, 1994). Parmi eux, la kinase Pka (Protéine kinase A) permet à son tour l'activation du facteur de transcription Creb (*C-AMP response element-binding protein*) qui initie l'expression de multiples gènes tels que *Creb* lui même (Waeber et al., 1991). Sous la dépendance de la Fsh, l'AMPc permet également l'augmentation rapide de l'influx de calcium dont la modulation des concentrations contrôle la dynamique des jonctions intercellulaires et notamment la cinétique d'ouverture de la BHT (Grasso and Reichert, 1990, Mruk and Cheng, 2004). Impliquée dans la régulation de la fonction architecturale de la cellule de Sertoli, l'augmentation par la Fsh des concentrations de Ca^{2+} permet l'activation de la kinase Calmodulline (CamK) qui intervient dans le réarrangement des composants du cytosquelette (Franchi and Camatini, 1985). Enfin, l'activation de Fshr est également à l'origine de l'induction des voies de signalisations Pi3k et Mapks dans les cellules de Sertoli encore immatures.

L'action de la Fsh est essentielle à la mise en place et au maintien de la physiologie testiculaire. Durant la période périnatale ainsi qu'à la puberté la signalisation Fsh contribue à la prolifération et la différenciation des cellules de Sertoli immatures (intervention des voies pro-prolifératives Pi3k/Mapks). La Fsh détermine ainsi le nombre de cellules de Sertoli à l'âge adulte et indirectement le rendement de spermatogenèse qu'elles seront en mesure de supporter (Sharpe et al., 2003). Ceci est illustré par les données recueillies à partir de souris mâles invalidées pour le gène codant Fsh ou Fshr, chez lesquelles il est observé une diminution du nombre de cellules germinales sans pour autant induire une altération de la fertilité (Krishnamurthy et al., 2000, Dierich et al., 1998).

A l'âge adulte la Fsh contribue au maintien de la spermatogenèse. Chez le rat, le défaut de production de Fsh (hypophysectomie), ou la perte de son activité (immunosuppression GnRH), se traduisent par une diminution du nombre de cellules germinales (spermatocytes/spermatides) associée à une altération nette de la survie des spermatogonies (1990). Ce défaut de spermatogenèse est en

partie restauré par l'administration de Fsh recombinante ; le nombre de cellules germinales pré-méiotiques est significativement augmenté par rapport aux animaux non traités (Russell et al., 1993, Singh and Handelsman, 1996). La Fsh n'est néanmoins pas suffisante à la progression des cellules germinales au delà des stades méiotiques-post-méiotiques et seul le co-traitement Fsh/testostérone, ou testostérone seule, permet la restauration des spermatides au sein de l'épithélium séminifère (O'Shaughnessy et al., 2009, Singh and Handelsman, 1996).

La Fsh contribue ainsi à la prolifération et à la survie des spermatogonies. Cette propriété est attribuée au soutien par la Fsh de l'activité globale des cellules de Sertoli. Ainsi, l'expression de près de 300 gènes sertoliens a été démontrée comme étant sous la dépendance de la Fsh (Sadate-Ngatchou et al., 2004). Parmi ceux impliqués dans la fonction sécrétrice de la cellule de Sertoli on retrouve la Transferrine (Suire et al., 1995), l'Abp (*Androgen binding protein*) (Morris et al., 1988), l'aromatase (Schteingart et al., 1999), la Ldh (Short et al., 1994), Igf-1 (Suwanichkul et al., 1993) ou encore le facteur de croissance Vegf (*Vascular endothelial growth factor*) (McLean et al., 2002). En lien direct avec le soutien des spermatogonies, les gènes codant les facteurs paracrines Gdnf (Tadokoro et al., 2002) et Scf (Taylor et al., 1996) sont induits sous l'effet de la Fsh. Le récepteur des androgènes Ar est de même augmenté en réponse à la Fsh. Ce dernier permet de cette manière de sensibiliser la cellule de Sertoli à la testostérone (Blok et al., 1989; Verhoeven and Cailleau, 1988). Enfin, la Fsh supporte les fonctions structurales de la cellule de Sertoli (liaison spermatides-Sertoli essentiellement) de part la régulation de l'expression d'acteurs du cytosquelette (Actine ou Tubuline) ou des constituants des jonctions intercellulaires (N-Cadhérine, Caténine, Lampa et al., 1999, Sadate-Ngatchou et al., 2004).

b) Autres hormones

Outre sa dépendance vis-à-vis de la Fsh, la cellule de Sertoli est sensible à d'autres hormones synthétisées au niveau périphérique. Ainsi, les hormones thyroïdiennes (Th, *Thyroid hormone* et Tsh, *Thyroid stimulating hormone*), les hormones de croissance Gh et Igf-1 ainsi que l'insuline sont-elles capables de moduler directement la physiologie des cellules de Sertoli par l'intermédiaire de leurs récepteurs respectifs (Petersen and Soder, 2006). Leur intervention est principalement décrite durant la période fœtale et néonatale où elles jouent un rôle prépondérant pour le maintien de la cinétique des phases de prolifération-différenciation des cellules de Sertoli immatures, en lien avec le contrôle de leurs fonctions métaboliques.

L'hypothyroïdisme est par exemple associé à une augmentation du volume testiculaire causé par la prolongation de la phase de multiplication des cellules de Sertoli (van Haaster et al., 1993, Palmero et al., 1995). Sur le plan métabolique, l'effet des hormones thyroïdiennes est illustré par des expériences menées sur des cultures primaires de Sertoli immatures issues de rats. Leur

traitement par la T3 stimule la synthèse protéiques et la production de lactate, tandis qu'il inhibe la sécrétion d'Abp et la synthèse d'ADN (Fugassa et al., 1987, Palmero et al., 1995). Cet effet est dépendant du stade de maturation des cellules de Sertoli puisqu'aucune de ces modulations métaboliques n'est observée lors du traitement de cultures primaires dérivées de mâles pubères (Palmero et al., 1995).

La production d'Igf-1 a lieu majoritairement au sein du foie (90%) (Humbel 1990). Il s'agit d'un des nombreux facteurs de croissance produits localement par la cellule de Sertoli ainsi que par les cellules de Leydig et les cellules germinales, toutes exprimant à leur surface le récepteur Igf1R (Treset al.1986 ; Vannelli et al. 1988 ; Cailleau et al.1990). Igf-1 est ainsi impliqué dans le contrôle systémique des fonctions testiculaires mais se trouve également au cœur de l'interaction paracrine/autocrine des différents types cellulaires qui composent le testicule. Son implication pour la régulation de la physiologie sertolienne a été illustrée récemment par l'étude de souris invalidées pour le récepteur Igf1r spécifiquement dans les cellules de Sertoli (Pitetti et al., 2013). Ces dernières présentent une diminution de 75% de la taille du testicule et de la production de spermatozoïdes à l'âge adulte. Ce phénotype a pu être associé à une réduction du taux de prolifération des cellules de Sertoli durant la période fœtale et néonatale. D'autres études montrent *in vitro* que le traitement par Igf-1 de cellules de Sertoli immatures isolées à partir de rat favorise le métabolisme du glucose, la synthèse de lactate ainsi que la production et sécrétion de transferrine (Mita et al., 1985). Igf-1 est ainsi un facteur trophique impliqué dans le soutien de la phase de prolifération néonatale des cellules de Sertoli. D'autre part, chez le rat adulte, l'administration de Igf-1 améliore l'atrophie testiculaire induite dans un modèle de cirrhose induite chimiquement par le CCl₄ (tétrachlorure de carbone) en restaurant entre autre l'expression de la transferrine (Castilla-Cortázar et al., 2004).

2.2.2. Contrôle paracrine

Comme évoqué précédemment par l'exemple de la production testiculaire de Igf-1, un réseau complexe de facteurs autocrines et/ou paracrines est à l'origine de la coopération et synchronisation des événements entre les cellules de Sertoli, les cellules germinales et les cellules de Leydig.

Au côté de l'action locale des stéroïdes testiculaires (testostérone et œstrogène), plusieurs molécules de la superfamille des cytokines présentes dans le microenvironnement épithélial font partie intégrante de ce système.

Parmi ces dernières, l'Il-1 α est synthétisée à la fois par les cellules germinales et par les cellules de Sertoli elles-mêmes et ce dépendamment des phases de l'épithélium séminifère (Jonsson et al., 1999). Elle agira ainsi de manière paracrine et autocrine pour la régulation des fonctions

métaboliques de la cellule de Sertoli et induit entre autre la production de lactate (Karzai and Wright, 1992, Nehar et al., 1998). Autre exemple de contrôle paracrine des fonctions sertoliennes par les cellules germinales, le $Tnf\alpha$ est capable de stimuler la production de transferrine et de lactate (Sigillo et al., 1999, Boussouar et al., 1999). Tout comme la production d'Il-1 α , l'effet du $Tnf\alpha$ (*Tumor necrosis factor*) sur les cellules de Sertoli est montré comme étant dépendant des stades du cycle de l'épithélium séminifère (Boockfor and Schwarz, 1991, De et al., 1993). Ainsi, les cytokines participent-elles au dialogue entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli et permettent de synchroniser la cinétique de différenciation de la lignée germinale avec les besoins métaboliques adaptés à son soutien.

La sécrétion des cytokines $Tnf\alpha$ ou Il1 α par les cellules germinales contribue également au contrôle de la restructuration des jonctions intercellulaires au cours de la spermatogenèse. Des expériences menées *in vitro* dans des lignées de cellules de Sertoli et *in vivo* chez la souris, montrent que ces dernières régulent négativement l'expression des gènes codant l'Occludine, la Claudine-11 ou la protéine adaptatrice Zo-1, constituants majeurs des jonctions serrées (Lui et al., 2001, Lui et al., 2003a, Li et al., 2006). Cette régulation met en jeu la cascade de phosphorylation des Mapks et son inhibition protège *in vivo* comme *in vitro* de la déstabilisation des jonctions (Xia and Cheng, 2005). Les cytokines sont également capables d'agir directement au niveau de la lignée germinale pour le contrôle de l'intégrité des jonctions intercellulaires. Le traitement par du $Tnf\alpha$ et de l'Inf γ (Interféron gamma) dans une lignée cellulaire GC-2spd(ts) conduit à la répression de l'expression des transcrits codant Jam-c, protéine retrouvée dans le testicule de rat au niveau des jonctions spécialisées ectoplasmiques apicales uniquement (Lui and Cheng, 2007). Outre la régulation de l'expression des constituants des jonctions cellulaires, le $Tnf\alpha$ perturbe l'intégrité des jonctions serrées en stimulant la production sertolienne de la métalloprotéases Mmp9. Parallèlement, il favorise la sécrétion de constituants de la matrice extracellulaire (collagène) et permet la production d'inhibiteurs de Mmp-1 (Timp-1) pour permettre leur reformation (Siu et al., 2003). La balance de production des cytokines est ainsi un moyen paracrine pour les cellules germinales de réguler l'ouverture transitoire de la BHT nécessaire à leur progression dans le compartiment luminal du tube séminifère au cours de la spermatogenèse.

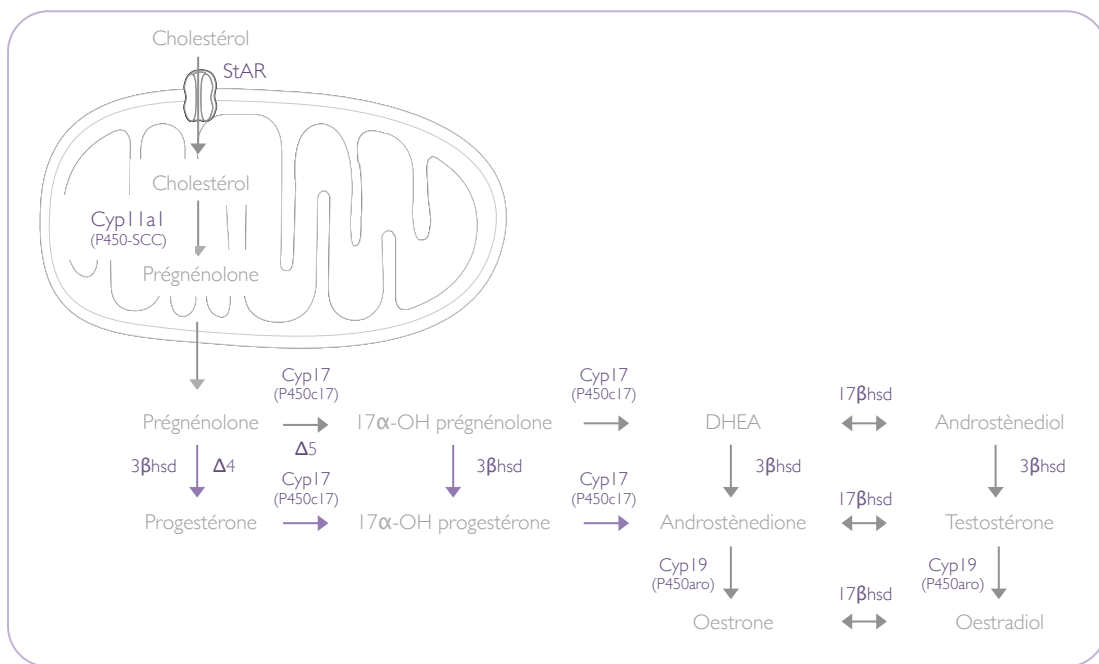


Figure 18. Voies de biosynthèse des stéroïdes testiculaires.

Dans les cellules de Leydig, la synthèse de testostérone à partir du cholestérol est assurée par la voie $\Delta 4$ (flèches violettes) et $\Delta 5$ (flèches grises). La voie $\Delta 4$ est la voie majoritaire chez la souris tandis que la voie $\Delta 5$ est majoritaire chez l'homme.

Star, *Steroidogenic acute regulatory protein* ; Cyp11a1 (P450scc), *cytochrome P450 side chain cleavage* ; 3 β hsd, *3-beta hydroxysteroid dehydrogenase* ; Cyp17 (P450c17), *cytochrome p450 17-alpha hydroxylase/17,20 lyase* ; 17 β hsd, *17-beta hydroxysteroid dehydrogenase* ; DHEA, *déhydroépiandrostérone* ; Cyp19 (P450aro), *cytochrome p450 aromatase*

B. L'espace interstitiel

L'espace interstitiel, parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques, assure la diffusion des nutriments (fer, vitamines A et E...), hormones (Lh, Fsh, insuline...), et facteurs de croissance (Egf – *Epidermal growth factor*...) nécessaires à la spermatogenèse (Li et al., 2011, Shiraishi et al., 2011). Il contient également des cellules immunitaires, principalement des macrophages, ainsi que des cellules spécifiques : les cellules de Leydig. Ces dernières, sous le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire et en réponse à la Lh, assurent la production des stéroïdes testiculaires, essentiellement sous la forme de testostérone.

1. Biosynthèse des androgènes testiculaires chez la souris

La testostérone constitue chez l'homme la principale source d'androgènes circulants. Les cellules de Leydig en assurent la majorité de la production (95%) ; d'autres organes tels que la surrénale chez l'homme ne contribuent que de façon mineure à sa synthèse.

Chez la souris, la testostérone est produite à partir du cholestérol selon une cascade enzymatique initiée par la protéine de transfert Star (*Steroidogenesis activator protein*) (Hou et al., 1990, Stocco, 1997) (Figure 18). Exprimée et activée sous la dépendance de la Pka en réponse à l'activation du récepteur Lh-r par la Lh (Clark and Stocco, 1995), Star conduit le transfert du cholestérol au sein des mitochondries. L'invalidation de son gène entraîne une accumulation de cholestérol dans les cellules stéroïdogènes, conséquence du défaut quasi-total de synthèse de stéroïdes (Bose et al., 1996). Star est donc l'acteur d'une étape dite limitante pour la synthèse d'androgènes.

Dans la mitochondrie, le cholestérol est clivé et ainsi converti en prégnénolone. Cette réaction est prise en charge par le cytochrome P450_{scc} (*side-chain clivage*) codé par le gène *Cyp11a1*. La prégnénolone diffuse à travers la membrane mitochondriale et rejoint le réticulum endoplasmique où deux voies enzymatiques alternatives aboutissent à la synthèse de testostérone.

Dans le testicule humain, la voie préférentielle est la voie dite Delta 5 ($\Delta 5$). Elle fait intervenir l'enzyme P450C17 (Cyp17) qui, sous la dépendance de la Lh, convertit la prégnénolone en 17 α -hydroxyprégnénolone, elle-même convertit en déhydroépiandrostérone ou DHEA (Conley and Bird, 1997). L'action successive des complexes réducteurs 3 β -hydroxystéroïde deshydrogénase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$ -isomerase (3 β hsd) et 17 β -hydroxystéroïde deshydrogénase (17 β hsd) aboutit respectivement à la production des intermédiaires androstènedione et d'androsténediol et à leur conversion en testostérone.

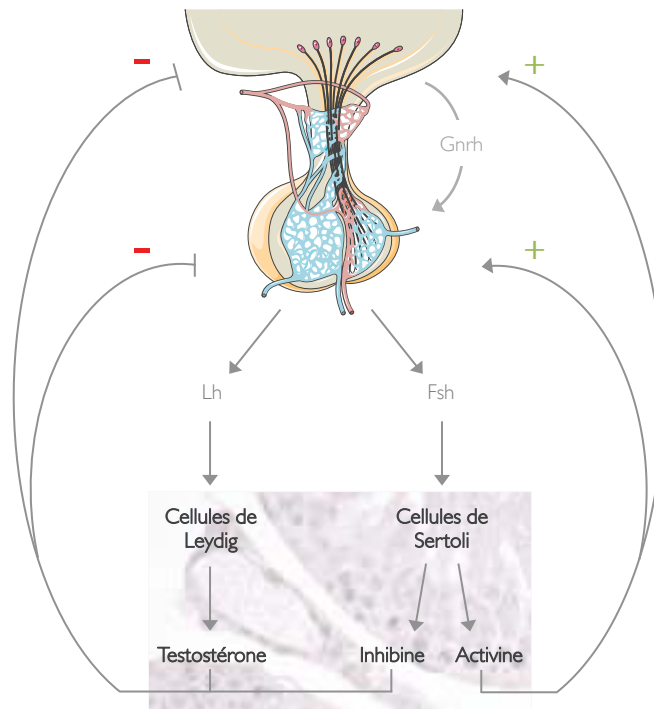


Figure 19. Contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (Gnrh) qui régule les sécrétions de l'hypophyse. L'hypophyse sécrète deux gonadotrophines : la Fsh et la Lh qui agissent sur les cellules de Sertoli et les cellules de Leydig respectivement. En réponse à la Fsh, les cellules de Sertoli libèrent les activines et inhibines qui exercent respectivement un contrôle positif et négatif sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. En réponse à la Lh, la cellule de Leydig sécrète la testostérone qui intervient de façon directe sur la cellule de Sertoli pour en réguler les fonctions. La testostérone circulante agit principalement pour le développement et le maintien des organes reproducteurs. Par le rétro-contrôle qu'elle exerce sur les sécrétions de Lh et de Fsh, cette dernière participe à au contrôle de sa propre synthèse.

Gnrh, *Gonadotropin releasing hormone* ; Lh, *Luteinizing hormone* ; Fsh, *Folliculo-stimulating hormone*

La voie alternative, dite Delta 4 ($\Delta 4$), est initiée par la conversion de la prégnénolone en progestérone par la 3β hsd (Conley and Bird, 1997). La progestérone est le précurseur de androstènedione qui sera à son tour prise en charge par la 17β hsd pour donner lieu à la production de testostérone.

2. Régulation de la synthèse de testostérone

La régulation de la synthèse des androgènes testiculaires met en jeu un réseau complexe de signaux d'origines multiples. Au côté de l'influence majoritaire de la Lh, d'autres facteurs endocriniens sont capables de moduler la synthèse de testostérone. C'est par exemple le cas de l'insuline, des hormones thyroïdiennes ou des glucocorticoïdes.

L'activité stéroïdogène des cellules de Leydig est également régulée localement par de multiples acteurs autocrines et paracrines. On note parmi eux les facteurs de croissance Igf-1, Tgf α et β ou encore les cytokines Il-1 α et β (Bornstein et al., 2004, Saez, 1994). En plus d'agir au niveau central pour limiter la libération de la Lh, la testostérone et les œstrogènes permettent de réguler localement leur propre synthèse. Par ailleurs, il est aujourd'hui reconnu qu'un certain nombre de récepteurs nucléaires dont l'activité est entre autre dépendante des concentrations intracellulaires de lipides (oxystérols, phospholipides...) interviennent dans le contrôle de l'expression des enzymes stéroïdogènes.

2.1. Contrôle par l'axe neuro-endocrinien hypothalamo-hypophysaire

La synthèse de testostérone est majoritairement sous la dépendance de l'axe neuro-endocrinien hypothalamo-hypophysaire (Figure 19). Les cellules hypothalamiques neuro-sécrétoires libèrent de manière pulsatile la gonadolibérine GnRh. Cette libération est sous influence de neurones spécifiques dont l'activité est particulièrement sensible aux signaux environnementaux et nutritionnels (Maeda et al., 2010). La GnRh va mener son action au niveau des cellules gonadotropes de l'hypophyse par l'intermédiaire de son récepteur, le récepteur GnRh-r (*Gonadotropin-releasing hormone receptor*). Son activation permet la sécrétion des gonadotrophines Lh et Fsh dans le système veineux. Leurs rôles sont distincts et complémentaires vis-à-vis de la régulation des fonctions de reproduction et plus particulièrement de la physiologie testiculaire. Tandis que la Fsh agit directement sur les cellules de Sertoli pour en soutenir les fonctions (Sultan et al., 1992), la Lh intervient au niveau des cellules de Leydig pour réguler la synthèse d'androgènes ; androgènes dont la production est essentielle au maintien des fonctions sertoliennes nécessaires à la spermatogenèse. La libération des gonadotrophines par l'axe est en retour réprimée par la testostérone, les oestrogènes circulants ainsi que par l'Inhibine synthétisée par les cellules de Sertoli en réponse la Fsh.

La régulation de la stéroïdogénèse par la Lh intervient à deux niveaux : tout d'abord dans le transfert du cholestérol de la membrane externe à la membrane interne de la mitochondrie ; ensuite dans la régulation de l'activité des systèmes enzymatiques du réticulum endoplasmique assurant les dernières étapes de conversion du précurseur prégnénolone en testostérone. Cette action est médiée par l'activation du récepteur Lh-r (*Luteinizing hormone receptor*) présent à la membrane des cellules de Leydig (McFarland et al., 1989). Couplé aux protéines G, sa stimulation par la Lh permet l'activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation des concentrations d'AMPc intracellulaires menant entre autre à l'activation de la Pka (Dufau, 1998). Par cette voie, la Lh permet l'induction de la transcription des gènes *Star* (Clark and Stocco, 1995), *Cyp11a1* ou *3βhsd* (Keeney and Mason, 1992).

2.2. Régulation de la stéroïdogénèse par les récepteurs nucléaires : exemple des interactions entre Lrh1/Sf1 et Shp/Dax-1

L'activité des cellules stéroïdogènes est régulée localement par de multiples récepteurs nucléaires (Maqdasy et al., 2013). Parmi ces derniers, les récepteurs Sf-1 (*Steroidogenic factor 1*, Nr5a1, *Nuclear receptor 5a1*) (Caron et al., 1997; Chau et al., 1997; Leers-Sucheta et al., 1997) et Lrh-1 (*Liver receptor homolog 1*, Nr5a2) (Mueller et al., 2006; Sirianni et al., 2002; Wang et al., 2001a, 2001b) sont des régulateurs majeurs de la synthèse des stéroïdes surrénaliens et testiculaires. Dans les cellules de Leydig, leur liaison à des éléments de réponses communs sur le promoteur de la majorité des gènes codant les enzymes stéroïdogènes (*Star*, *Cyp11a1*, *3βhsd*, *Cyp17a1*) permet de contrôler positivement la synthèse de la testostérone. Les ligands endogènes de Lrh-1 et Sf-1 demeurent à ce jour méconnus. Certaines études suggèrent que des phospholipides pourraient être à l'origine de l'induction de leur propriété transactivatrice et contribuer ainsi à favoriser la production des androgènes (Ortlund et al., 2005, Whitby et al., 2011).

A l'inverse, la stéroïdogénèse est régulée négativement par les récepteurs nucléaires Dax-1 (*Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenital critical region on X chromosome, gene1*, Nr0B1) et Shp (*Small heterodimer partner*, Nr0b2) tous deux présents dans les cellules de Leydig. Ces derniers appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires orphelins. Ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, ils ont la propriété de se fixer à d'autres récepteurs nucléaires et d'agir en tant que co-répresseur pour limiter leur capacité transactivatrice (Zanaria et al., 1994). Dans les cellules de Leydig, Shp se fixe aux récepteurs Sf-1 et Lrh-1 et limite l'expression des enzymes *Star*, *Cyp11a1* et *3βhsd* (Volle et al., 2007). Les souris mâles invalidées pour le gène *Shp* présentent une maturation sexuelle précoce associée à une augmentation de la synthèse de testostérone (Volle et al., 2007). De la même manière que Shp, Dax-1 est capable d'interagir avec les facteurs de transcriptions stéroïdogènes Sf-1 et Lrh-1 (Ito et al., 1997). Une récente étude montre, *in vitro* dans des cellules de

Leydig tumorale, et *in vivo* chez la souris, que l'induction de l'expression de *Dax-1* en réponse à un traitement par l'insuline induit la répression des enzymes de la stéroïdogénèse (Ahn et al., 2013).

2.3. Les androgènes: biodisponibilité et mode d'action

La testostérone diffuse librement à travers la membrane des cellules de Leydig et s'équilibre rapidement dans les différents compartiments testiculaires. Elle va ainsi pouvoir agir au niveau local, principalement au niveau des cellules de Sertoli, ou rejoindre la circulation sanguine pour atteindre ses tissus cibles en périphérie.

Dans le plasma, elle n'est présente qu'en faible proportion (2%) sous forme libre et se trouve majoritairement liées aux protéines de transport Tebg (*Testosterone binding-globuline*) ou Shbg (*Sex hormone binding-globuline*), ou encore à l'albumine (Rosner, 1991). Dans ces tissus cibles, la testostérone peut être active sous sa forme native. Elle peut également être convertie en métabolites secondaires dont l'activité hormonale permet de renforcer et de diversifier les effets biologiques de la testostérone. Les deux androgènes qui se fixent et activent naturellement le récepteur aux androgènes Ar sont la testostérone et son dérivé la 5 α -dihydrotestostérone ou DHT (Wilson and French, 1976). La DHT est issue de la réduction de la testostérone par la 5 α -réductase, enzyme présente dans la plupart des organes périphériques androgéno-dépendants (épididyme, peau, prostate et foie) (Russell and Wilson, 1994). La DHT exerce une activité hormonale plus puissante que celle de la testostérone elle-même de par son affinité supérieure pour Ar (Wilson and French, 1976). Dans le testicule, la 5 α -réductase est absente et l'androgène actif est la testostérone.

Les androgènes rejoignent le compartiment intracellulaire de leurs cellules cibles par simple diffusion transmembranaire. Ils se lient alors à Ar, présent sous forme inactive au niveau cytoplasmique et/ou nucléaire. Membre de la famille des récepteurs nucléaire, Ar est un facteur de transcription inductible par son ligand (Helsen and Claessens, 2014). La fixation de l'androgène induit un changement de conformation permettant son recrutement avec une forte affinité sur les éléments de réponse ARE (*Androgen response element*) situés sur le promoteur des gènes androgéno-dépendants. En association avec ses co-activateurs, AR va initier l'expression de ses gènes cibles par le recrutement de la machinerie transcriptionnelle.

La testostérone est également capable d'agir indépendamment de la voie dite classique attribuée aux effets génomiques de Ar (Foradori et al., 2008). Sa liaison à Ar permet l'activation de voies de signalisations cytoplasmiques telles que la cascade des Mapks ou la voie Pi3k : on parle d'effets non-génomiques puisque indépendants de la fixation de Ar sur le promoteur de ses gènes cibles.

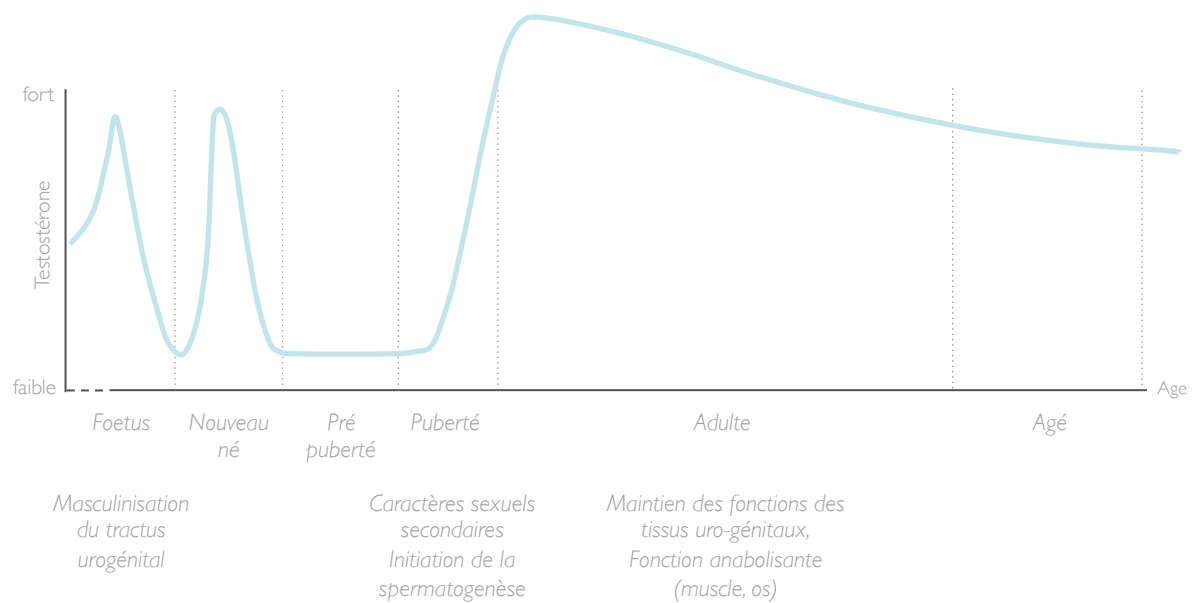


Figure 20. Cinétique de la production de testostérone chez l'homme et fonctions associées.

A la 14^{ème} semaine du développement embryonnaire, les cellules de Leydig fœtales se différencient à partir du mésenchyme du primordium gonadique. Elles seront dès lors responsables d'un premier pic sécrétoire de testostérone. Celui-ci est associé à la masculinisation du tractus urogénital (différenciation des canaux de Wolff en épидидyme, canaux déférents et vésicules séminales). A la puberté, l'augmentation de la pulsativité de la GnRH est responsable d'un nouveau pic de synthèse de testostérone par les cellules de Leydig. Il permet le développement des caractères sexuels secondaires et l'initiation de la spermatogenèse par l'acquisition de la maturité fonctionnelle des cellules de Sertoli. A l'âge adulte, le maintien des concentrations de testostérone est nécessaire à l'entretien des cycles de spermatogenèse ainsi qu'au maintien de la fonction des organes différenciés du tractus génital (prostate, épидидyme, vésicule séminale). La testostérone possède également un pouvoir anabolisant favorisant le développement du muscle ou encore de l'os.

3. Androgènes et fonctions testiculaires

La production des androgènes est essentielle à la mise en place des fonctions de reproduction (Figure 20). Pendant la vie fœtale, la testostérone et son dérivé métabolique, la DHT, sont responsables respectivement de la masculinisation du tractus urogénital (différenciation des canaux de Wolff en épididymes, canaux déférents et vésicules séminales) et de la morphogenèse des organes génitaux externes mâles (pénis, scrotum) (Wilson et al., 1981). Chez l'homme, des mutations affectant les fonctions de AR entraînent une insensibilité partielle (PAIS, *partial androgen insensitivity syndrome*) ou complète aux androgènes (CAIS, *Complete androgen insensitivity syndrome*) et l'infertilité (Subramaniam et al., 2013). Dans les formes complètes, le phénotype est totalement féminin : absence de caractères sexuels secondaires à la puberté (aménorrhée, diminution pilosité pubienne et axillaire), défaut de descente testiculaire (cryptorchidie) ne permettant pas une gamétogenèse complète (Oakes et al., 2008).

A la puberté, les androgènes assurent le développement des caractères sexuels secondaires (musculature, croissance osseuse, pilosité pubienne et axillaire), la mise en place de l'activité sécrétrice de tractus génital (prostate, épididyme, vésicules séminales) et l'initiation de la spermatogenèse par l'acquisition de la maturité fonctionnelle des cellules de Sertoli (Tan et al., 2005). Outre l'augmentation des androgènes, la puberté est, chez l'homme, caractérisée par un ensemble de changements hormonaux comme une augmentation de GH (*Growth hormone*) ou d'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) qui participent également à la croissance osseuse et musculaire.

A l'âge adulte, une partie des effets des androgènes est définitive ou irréversible. En effet, une fois la puberté installée, si la production des androgènes cesse, les structures génitales ne régressent pas. La testostérone demeure cependant indispensable au maintien des fonctions différenciées de certains tissus uro-génitaux (prostate, épididyme, vésicules séminales) (Wilson et al., 1980). Elle possède également un pouvoir anabolisant sur le muscle squelettique, participe au développement de l'os, au métabolisme du tissu adipeux ou encore à la masculinisation du cerveau (Urban et al., 1995, Finkelstein et al., 1989, Sato et al., 2004).

Tout au long de la vie de l'individu, la testostérone joue un rôle majeur pour le soutien de la gamétogenèse. Cette fonction est illustrée par le développement de multiples modèles expérimentaux pour lesquels la diminution de la production d'androgènes (hypophysectomie, saturation de l'axe hypothalamo-hypophysaire par la GnRh, perte de fonction des récepteurs aux gonadostimulines) (Eacker et al., 2008, Huhtaniemi et al., 2002, Layman, 2000) ou la perte de fonction de leur récepteur Ar (souris *Tmf* ou *ArKO*) (Chang et al., 2013) sont associées à une apoptose massive de la lignée germinale au stade spermatocytes et à un arrêt de la spermatogenèse. Il est ainsi admis que les taux de

testostérone sont indispensables à la survie et la progression de la différenciation de la lignée germinale.

Dans le testicule humain ou celui des rongeurs, AR est exprimé dans la majorité des types cellulaires. On le retrouve au sein des cellules de Leydig, des cellules de Sertoli, des cellules péri-tubulaires ainsi que dans les stades tardifs de la lignée germinale (spermatides rondes et allongées) (Vornberger et al., 1994, Suárez-Quian et al., 1999). Son action pour le soutien de la spermatogenèse reste néanmoins centrée sur le contrôle des fonctions des cellules somatiques (2001). La testostérone peut ainsi agir directement au niveau testiculaire au contact des cellules de Leydig et des cellules de Sertoli ; et d'autre part de manière indirecte de part son action sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

3.1. Testostérone et stéroïdogenèse de la cellule de Leydig

Dans le testicule, la testostérone agit localement sur les cellules de Leydig afin de favoriser et d'entretenir sa propre synthèse. Cette boucle de contrôle autocrine met en jeu l'activation de Ar. Les souris invalidées pour *Ar* spécifiquement dans les cellules de Leydig (souris *L-AR-/y*) sont stériles et présentent une diminution des concentrations de testostérone malgré un taux de Lh élevé (Xu et al., 2007). L'infertilité est ici associée à un arrêt de la spermatogenèse au stade de spermatide, conséquence de l'altération des fonctions sertoliennes dépendantes de la testostérone.

Les mécanismes moléculaires précis qui conduisent Ar à la régulation de la stéroïdogenèse au sein des cellules de Leydig restent à ce jour méconnus. Les souris *L-AR-/y* présentent un défaut d'expression de plusieurs enzymes clefs de la stéroïdogenèse telles que Cyp17, 17 β hsd ou 3 β hsd (Xu et al., 2007). En l'absence de Ar fonctionnel, ces anomalies d'expression sont associées à un développement et à une maturation anormale des cellules de Leydig adultes (O'Shaughnessy et al., 2002).

Plusieurs études montrent à l'inverse que dans des cellules de Leydig matures, l'expression de ces mêmes enzymes est régulée négativement par les androgènes. Ar intervient entre autre dans la répression de la propriété transactivatrice du récepteur nucléaire Nur77 sur le promoteur de gènes codant des enzymes de la stéroïdogenèse (Song et al., 2012). D'autre part, les androgènes diminuent l'expression de *Star*, enzyme limitante de la synthèse de testostérone (Houk et al., 2004, Eacker et al., 2008). La testostérone agirait ainsi au niveau local dans le rétrocontrôle de sa propre synthèse.

3.2. Testostérone et fonctions sertoliennes

Accumulée au niveau de l'espace interstitiel, la testostérone est capable de traverser la lame basale des tubes séminifères pour arriver au contact des cellules de Sertoli. Elle va ainsi pouvoir interagir directement avec ces dernières pour participer à la régulation des fonctions qui leur sont associées.

A ce jour, les mécanismes moléculaires mis en jeu par la testostérone pour le contrôle de la physiologie de la cellule de Sertoli restent encore à définir. Les premières études se sont basées sur la comparaison des transcriptomes de testicule de souris sauvages ou invalidées pour le gène codant AR spécifiquement dans les cellules de Sertoli (souris *S-Ar-/y*). Les souris *S-Ar-/y* sont stériles et présentent un arrêt de la spermatogenèse en phase de première division méiotique (spermatocyte primaire) (Chang et al., 2004). Celle-ci est essentiellement attribuée à un défaut de développement morphologique des cellules de Sertoli (défaut de positionnement nucléaire et des éléments du cytosquelette) et à un retard de mise en place de la BHT dont l'intégrité et la dynamique demeurent affectées. Ce phénotype histologique est entre autre associé à une diminution des niveaux d'expression de transcrits codant les protéines Vimentine ou Laminine- $\alpha 5$, respectivement impliquées dans la composition du cytosquelette ou de la matrice extracellulaire de la cellule de Sertoli. De même, les niveaux des transcrits de protéines de jonctions mises en jeu dans la composition des spécialisations ectoplasmiques basales et apicales (Occludine, Cadhérine, Jam3 ou Zo1) sont diminués dans le testicule des souris mutantes *S-Ar-/y* (Yan et al., 2008b).

Récemment le développement de la stratégie RIBOTAG appliquée à des souris sauvages ou *S-Ar-/y* (nommées respectivement SCRIBO et SCARIBO) a permis l'identification d'un panel plus large de transcrits dont la traduction est sous la dépendance de l'activation de Ar par les androgènes (2014). Parmi eux, le récepteur *Tgfb2*, l'inhibiteur des métalloprotéases *Timp1* et d'autres régulateurs du remaniement du cytosquelette (*Mybph*, *Myosin binding protein H* ; *Mybpc*, *Myosin-binding protein C*) viennent appuyer le rôle clef des androgènes pour la régulation de la dynamique de l'épithélium séminifère (Yan et al., 2008c). Une récente étude basée sur l'analyse des souris *S-Ar-/y* a permis de mettre en évidence dans les cellules de Sertoli la régulation par Ar de l'expression des gènes *Claudine-3* et *Claudine-13* (Chakraborty et al., 2014).

La voie de signalisation dépendante de Ar régule également les fonctions nutritives et paracrine de la cellule de Sertoli. Nécessaire au soutien de la gamétogenèse, l'expression de la *Transferrine*, glycoprotéine impliquée dans le transport du fer, est dépendante de l'action des androgènes (Skinner and Griswold, 1982). D'autres acteurs du métabolisme de la Vitamine D (*Vdr*, *Vitamine d receptor* ou *Cyp27a1*), des acides gras (*Fabp*, *fatty acid binding protein*) ou encore des

rétinoïdes (Cyp26b1 ou Crbp1, *Cellular retinol binding protein-1*) ont également été identifiés comme étant modulés par les androgènes et Ar (2014). Plus inattendue, la perte de fonction de Ar dans les cellules de Sertoli se trouve associée à l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'initiation de la différenciation ovarienne (Foxl2, *Forkhead box l2*) (2014). Ainsi la signalisation androgénique pourrait-elle être impliquée dans l'inhibition du programme de différenciation femelle.

Parmi les gènes dont l'expression est sous la dépendance des androgènes, une faible proportion dépend de l'activité génomique de Ar. Parmi eux, le facteur de transcription Rhox5 (*Reproductive homeobox X-linked 5*) ou Pem, pourrait compléter l'action génomique de Ar et servir d'intermédiaire à la modulation de l'expression de nombreux gènes androgéno-dépendants (MacLean et al., 2013). Les souris mâles invalidées pour *Rhox5* sont hypofertiles et présentent une diminution du nombre de tubes dont la gamétogenèse est complète (Rao et al., 2003, Hu et al., 2007, Lui and Cheng, 2012). D'autre part, Ar est capable de répondre à son activation par la testostérone en induisant des voies de signalisation cytoplasmiques : la testostérone agit ainsi de manière alterne dite « non classique ». Dans les cellules de Sertoli, Ar est particulièrement accumulé à proximité de la membrane cytoplasmique où il permet l'activation de la cascade de phosphorylation des Mapks ou encore de la kinase membranaire c-Src (Fix et al., 2004, Cheng et al., 2007). L'activation de ces signalisations entraîne l'expression d'un panel de gènes bien plus large que celui sous l'influence directe des éléments de réponse à AR. Elle permet également de moduler le statut de phosphorylation et donc la localisation et la stabilité de protéines appartenant aux complexes de jonctions intercellulaires de la cellule de Sertoli. C'est par ce mécanisme, et plus particulièrement par la régulation de la cinétique d'activation de c-Src et de la cascade des Mapks, que les androgènes et la Fsh sont impliqués dans le maintien de l'adhésion des spermatocytes et spermatides aux cellules de Sertoli ainsi que dans le relargage des cellules germinales matures dans la lumière du tube séminifère (2010).

4. Les oestrogènes : métabolites actifs de la testostérone

La testostérone est métabolisée par l'aromatase en un oestrogène puissant, l'oestradiol (E2). Chez l'homme, l'aromatase ou cytochrome P450arom est codée par un gène unique CYP19. Tandis que la majorité des oestrogènes circulants proviennent de sources périphériques (graisse, peau, os ou cerveau), une quantité non négligeable d'oestrogènes est sécrétée dans le sang directement à partir du testicule (15%) (Jayle et al., 1962, Dorrington et al., 1978).

Chez les mammifères, l'aromatase est exprimée majoritairement dans les cellules de Leydig, reconnues comme la principale source de production des oestrogènes testiculaires à l'âge adulte (Carreau et al., 1999). On la retrouve également chez l'homme et chez le rongeur dans les stades tardifs de la lignée germinale (spermatides allongées et spermatozoïdes) où elle pourrait contribuer la

production de près de la moitié des oestrogènes testiculaires (Aquila et al. 2002; Lambard et al. 2004; Carreau et al. 2010).

L'importance de la synthèse des oestrogènes testiculaires chez l'homme a été illustrée par les travaux de Maffei (Maffei et al., 2007). Des patients présentant une inactivation du gène codant l'aromatase ont montré des altérations de la spermatogenèse à des degrés variables : certains présentent une gamétogenèse complète, pour d'autres celle-ci est fortement affectée (oligospermies voire azoospermies). D'autre part, les souris invalidées pour l'*Aromatase* présentent une perte progressive de la spermatogenèse qui se traduit par une infertilité dès l'âge de 1 an (Robertson et al., 1999). Cette dernière résulte d'une apoptose des spermatides ainsi que de la réduction de la viabilité et de la motilité du sperme (formation de l'acrosome). Ainsi, les oestrogènes testiculaires semblent-ils jouer un rôle clefs dans les processus de différenciation tardive et la maturation de la lignée germinale.

L'action des oestrogènes au niveau testiculaire est médiée par trois récepteurs aux propriétés distinctes. Les récepteurs alpha et beta ($Er\alpha$, *estrogen receptor alpha*, Nr3a1 et $Er\beta$, *estrogen receptor beta*, Nr3a2) appartiennent à la sous-famille des récepteurs nucléaires. Activés par la fixation de leurs ligands, ils se trouvent recrutés au promoteur de leurs gènes cibles pour en réguler la transcription. Les oestrogènes sont également capables de lier un récepteur transmembranaire ; Gper, aussi appelé Gpr30 (*G protein-coupled estrogen receptor-1* ou *G protein-coupled receptor 30*). Associé à l'adenylate cyclase, l'activation de ce dernier permet de transduire rapidement le signal oestrogénique de part l'activation des multiples voies telles que la cascade des Mapks ou encore Pi3k ou l'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire.

Les récepteurs des oestrogènes sont présents dans la plupart des types cellulaires du testicule (Carreau et al., 2012)(Chimento et al., 2011). Néanmoins, les conclusions quant à leurs localisations précises restent largement controversées, notamment en raison d'une grande variabilité inter-espèces. Chez la souris, $Er\alpha$ est décrit dans les cellules de Leydig ainsi que dans les cellules de Sertoli (Zhou et al., 2002, Kotula-Balak et al., 2009) ; tandis que chez le rat son expression est étendue au compartiment germinale (Shughrue et al., 1998). Chez l'homme, sa présence est restreinte aux cellules germinales (Mäkinen et al., 2001). Les travaux d'Eddy décrivent pour la première fois le phénotype testiculaire associé à l'invalidation du récepteur *Erα*. Les souris mâles *Erα*^{-/-} présentent à 5 semaines une hypofertilité progressant jusqu'à l'infertilité à partir de 20 semaines (Eddy et al., 1996). L'atrophie testiculaire associée à ce phénotype résulte d'un défaut de réabsorption du fluide séminifère par les cellules épithéliales des canaux efférents.

Contrairement à l'invalidation de *Erα*, l'invalidation de *Erβ* chez la souris ne conduit pas à une stérilité (Couse et al., 1997). Seule une étude décrit une hyperplasie du tissu interstitiel et une

augmentation du nombre de spermatogonies suggérant le rôle de $Er\beta$ dans la régulation de la balance apoptose-prolifération (Gould et al., 2007). A ce jour les conclusions obtenues à partir de modèles murins invalidés pour le gène codant *Gper* montrent que celui-ci ne serait pas impliqué dans la régulation oestrogénique de la physiologie testiculaire ; les souris invalidées pour *Gper* sont fertiles (Sharma et al., 2013). Cependant, peu de données concernant la qualité de la spermatogenèse chez ces animaux sont disponibles et d'autres études sont nécessaires afin de statuer sur le rôle potentiel de *Gper* dans le testicule.

4.1. Oestrogènes et fonction Leydigienne

Les oestrogènes participent à la régulation de la stéroïdogenèse testiculaire de part le rétrocontrôle qu'ils exercent sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'oestradiol possède en effet des propriétés inhibitrices directes sur les cellules gonadotropes hypophysaires (Kawakami and Winters, 1999, Sharma et al., 1999). Son action, plus marquée que celle de la testostérone, porte à la fois sur la synthèse et la libération (pulsatilité) de la Lh.

Outre leur action centrale, les oestrogènes limitent la stéroïdogenèse au niveau local. L'activation par les oestrogènes de $Er\alpha$ dans des cultures primaires de cellules de Leydig murines se traduit par une répression de la synthèse des androgènes (Akingbemi et al., 2003). L'implication de $Er\alpha$ pour le contrôle de la stéroïdogenèse a été confirmée *in vivo*. Tandis que les souris *Er\beta*^{-/-} ne présentent aucune modulation de leur statut androgénique, les souris *Er\alpha*^{-/-} voient leurs concentrations de testostérone plasmatique augmentées par rapport aux souris sauvages (Eddy et al., 1996)(Dupont et al., 2000). De plus, ces dernières sont insensibles à la répression de la synthèse de testostérone attendue suite à l'exposition néonatale de DES. Dans ce contexte, l'inhibition par $Er\alpha$ de l'expression d'enzymes de la stéroïdogenèse telles que Star ou Cyp17a1 (Delbès et al., 2005) est dépendante du récepteur orphelin Shp (Volle et al., 2009).

Chez l'homme, $ER\alpha$ est absent des cellules de Leydig (Mäkinen et al., 2001). Pour autant l'exposition de cellules testiculaires humaines au Bisphénol A (BPA) entraîne une diminution de la production de testostérone suggérant l'implication d'une autre voie indépendante de $ER\alpha$ par laquelle les oestrogènes modulent la production d'androgènes (N'Tumba-Byn et al., 2012). Chez l'homme comme chez le rat, le récepteur GPER est présent dans les cellules de Leydig et des travaux récents montrent que son activation par l'oestradiol ou son ligand synthétique G-1 diminue la production de testostérone de près de 30% (Vaucher et al., 2014).

4.2. Oestrogènes et balance prolifération / apoptose de la lignée germinale

Dans la lignée germinale, les conclusions quant aux effets des oestrogènes sont variables et dépendent majoritairement des stades de différenciation et de l'espèce considérée. La stimulation par les oestrogènes des récepteurs $Er\alpha$ et $Gper$ entraînent l'activation des cascades de signalisation $Egfr/Erk/c-Jun$ et favorisent la prolifération d'une lignée cellulaire murine de spermatogonies-spermatocytes I (GC-1) (Sirianni et al., 2008). Ces mêmes voies sont empruntées par les oestrogènes dans les cellules germinales à des stades de différenciation plus tardifs. Dans des spermatocytes au stade pachytènes ainsi que dans des spermatides rondes, elles jouent cependant le rôle opposé et modulent l'expression de gènes codant pour des acteurs clefs de l'homéostasie cellulaire tels que Bax ou les Cyclines A1 et B1 en faveur d'un effet pro-apoptotique (Chimento et al., 2012, Chimento et al., 2011, Chimento et al., 2010).

D'autre part, les oestrogènes favorisent la survie et la prolifération des cellules de Sertoli par l'activation des voies $Egfr/Erk1/2-Pi3k-Cycline\ D1$ (Royer et al., 2012, Ge et al., 2014). Tout comme dans les cellules germinales, cet effet est médié d'une part par les $Er\alpha/\beta$ (prolifération) et d'autre part, par le récepteur membranaire $Gper$ (survie) (Lucas et al., 2008; Royer et al., 2012).

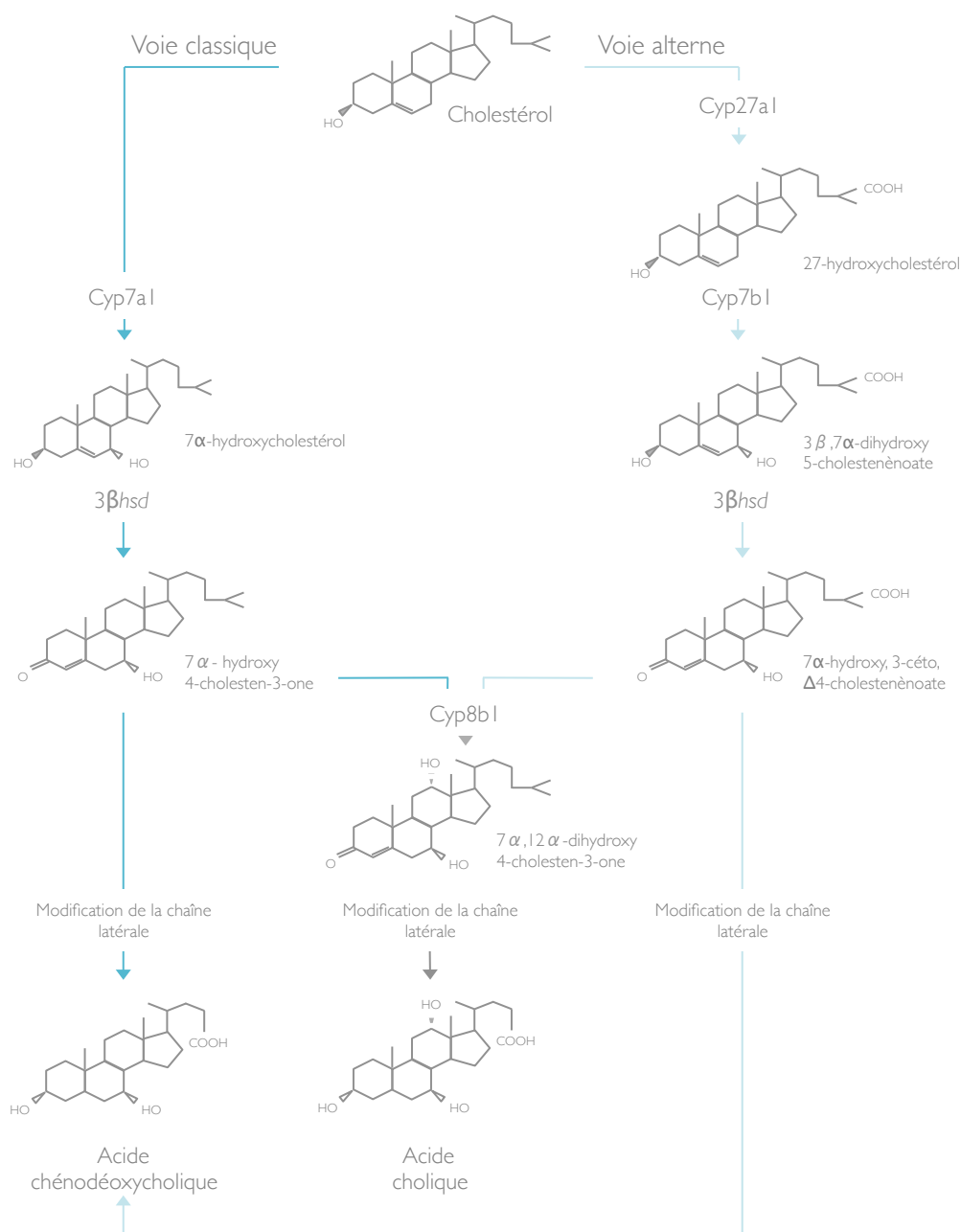


Figure 21. Représentation schématique des voies de synthèse des acides biliaires.

La synthèse des acides biliaires est réalisée au niveau hépatique à partir du cholestérol. On distingue deux voies de synthèse. La voie classique est initiée par la cytochrome Cyp7a1. La voie alterne requiert l'intervention de la cytochromes Cyp27a1 pour la production de dérivés oxystérols. L'enzyme Cyp7b1 prendra en charge l'étape d'initiation. Les composés oxydés ainsi produits seront convertis par la 3 β hsd avant de subir des modifications complémentaires du noyau stéroïdiens. L'enzyme Cyp8b1 détourne les voies de synthèse pour la production d'acide cholique. En son absence, la poursuite des réactions conduit à la production de l'acide chénodéoxycholique.

Cyp7a1, *cholesterol 7- α hydroxylase* ; Cyp27a1, *sterol 27-hydroxylase* ; Cyp7b1, *oxysterol 7- α hydroxylase* ; 3 β hsd, *3-beta hydroxysteroid dehydrogenase* ; Cyp8b1, *sterol 12- α hydroxylase*.

Partie 2. Les acides biliaires

Synthétisés essentiellement au niveau hépatique, les acides biliaires sont le constituant majeur de la bile et la principale source d'élimination du cholestérol dont ils sont issus. Libérés au sein du tractus digestif lors du repas, ils assurent la solubilisation et l'émulsion des graisses et en favorisent ainsi la digestion. Outre ce rôle physico-chimique, les acides biliaires possèdent des propriétés de molécules de signalisation par l'activation de récepteurs aux propriétés distinctes ; parmi eux le récepteur nucléaire Fxr α (*Farnesol-X-receptor alpha*, Nr1h4) et le récepteur membranaire Tgr5 (*G Protein-coupled bile acid receptor 1*, Gpbar1) sont à l'origine de la régulation du métabolisme des acides biliaires, mais également des métabolismes glucidique, lipidique et énergétique. Aux vues de leurs multiples fonctions physiologiques, le maintien de l'homéostasie des acides biliaires joue un rôle capital et plusieurs pathologies hépatiques sont associées à une accumulation des acides biliaires. Présents en concentrations trop élevées les acides biliaires deviennent détergents et provoquent la dérégulation des processus physiologiques qu'ils contrôlent.

A. Biosynthèse

1. Synthèse des acides biliaires primaires

La biosynthèse des acides biliaires a lieu essentiellement au niveau hépatique. Elle fait intervenir une série de modifications enzymatiques du noyau stéroïde ainsi que de la chaîne carbonée du cholestérol menant à la production des acides biliaires dits primaires : l'acide cholique (CA) et l'acide chénodéoxycholique (CDCA) (Russell, 2003). On distingue deux voies de synthèse différentes de part la nature de leurs intermédiaires métaboliques et les acteurs enzymatiques qu'elles mettent en jeu (Figure 21).

1.1. Initiation : voie classique et alterne

La première, dite classique ou voie neutre est à l'origine de 75% des acides biliaires chez la souris et 90% chez l'homme (Duane and Javitt, 1999, Schwarz et al., 1996). Elle est initiée par l'action de la cholestérol-7 α -hydroxylase (ou cytochrome Cyp7a1), enzyme responsable de la conversion du cholestérol en dérivé 7 α -hydroxy-cholestérol (Russell, 2003). Présente essentiellement au niveau hépatique, Cyp7a1 est l'enzyme limitante de la synthèse des acides biliaires (Schwarz et al., 1996). De multiples facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation de son expression et contribuent de cette façon au maintien de l'homéostasie des acides biliaires et du cholestérol dont ils sont issus (pour revue Chiang, 2009). Chez l'homme ou la souris, les récepteurs nucléaires orphelins Hnf4 α (*Hepatocyte nuclear factor 4 alpha*, Nr2a1) et Lrh1 (*Liver receptor homolog 1*, Nr5a2) se

fixent au promoteur de *Cyp7A1* et régulent positivement sa transcription par le recrutement de co-activateurs tels que Pgc-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Co-activator 1 alpha*) (Crestani et al., 1998, Nitta et al., 1999). Leur activité transactivatrice est régulée par de nombreux signaux d'ordre métabolique comme par exemple le glucagon (Song and Chiang, 2006) ou les acides biliaires eux mêmes. Chez la souris, la synthèse des acides biliaires est induite par l'accumulation de cholestérol dans le foie. Les oxystérols, dérivés oxydés du cholestérol, activent le récepteur nucléaire Lxr α (Liver x Receptor alpha, Nr1h3) (Janowski et al., 1996, Lehmann et al., 1997). En partenariat avec Lrh-1, celui-ci va alors stimuler la transcription de *Cyp7a1* (Lu et al., 2000) (Lehmann et al., 1997). Chez la souris sauvage, un régime riche en cholestérol conduit à l'augmentation de la synthèse d'acides biliaires tandis que cet effet est inexistant chez la souris invalidée pour *Lxra* (*Lxra*^{-/-}) (Peet et al., 1998). Il est à souligner que cette régulation a lieu exclusivement dans les hépatocytes murins ; chez l'homme le motif DR4 (Direct repeat 4) de fixation de LXR α sur le promoteur de *CYP7A1* n'est pas conservé.

Le développement de souris invalidées pour le gène *Cyp7a1* (*Cyp7a1*^{-/-}) a permis de mettre en évidence l'existence d'une seconde voie de synthèse des acides biliaires. Les souris *Cyp7a1*^{-/-} présentent une létalité post-natale importante consécutive à une insuffisance hépatique, à un défaut d'absorption intestinale des lipides et à une carence en vitamines (Ishibashi et al., 1996). Leurs concentrations en acides biliaires sont réduites de 75% par rapport aux souris sauvages (Schwarz et al., 1996). Chez les animaux survivants 25% de la production d'acides biliaires est maintenue, compensée par l'intervention d'une seconde voie de synthèse, dite voie alterne.

Contrairement à la voie de synthèse classique initiée directement à partir du cholestérol, la voie alterne requiert la production de dérivés oxystérols dont la forme majoritaire chez l'homme et la souris est le 27-hydroxy-cholestérol. Cette réaction est prise en charge par la *sterol-27-hydroxylase*, ou cytochrome Cyp27a1 (Russell, 2003). La synthèse des acides biliaires débutera alors par la conversion des oxystérols en dérivés 7 α -hydroxycholestérol sous l'action de l'enzyme *oxystérol-7 α -hydroxylase* (Cyp7b1) (Rose et al., 1997, Norlin et al., 2000).

A l'issue de cette étape d'initiation, les deux voies mènent à la production de dérivés stérols oxydés en position C7. Tous seront convertis en forme 3-oxo, 4 Δ par la *3 β -hydroxy- Δ 5-C27-steroid-oxidoreductase* (3 β hsd) (Russell, 2003) avant de subir des modifications complémentaires du noyau stéroïdien. L'enzyme *12-alpha-hydroxylase* (Cyp8b1) détournera la voie de synthèse en faveur de la production de CA (Chiang, 2009) ; en son absence, la synthèse aboutira à la production de CDCA ; elle déterminera de cette manière la composition finale du pool d'acides biliaires. Sa régulation transcriptionnelle est tout comme *Cyp7a1* dépendante de l'activité de Hnf4 α sur son promoteur (Zhang and Chiang, 2001).

La synthèse des acides biliaires primaires s'achève par le clivage de la chaîne latérale des dérivés stéroïdiens. Chez l'homme, la voie de synthèse classique est la voie de synthèse majoritaire (Duane and Javitt, 1999). Elle mène dans des conditions physiologiques à la production de CA et de CDCA en concentrations équivalentes. Chez la souris, la synthèse des acides biliaires primaires se poursuit par la conversion du CDCA en un acide biliaire plus hydrophobe et moins toxique ; l'acide muricholique (muri-CA) (Russell, 2003). Chez le porc, le CA est quasiment absent de la bile alors que l'acide hyocholique (hyo-CA), acide biliaire 6 α -hydroxylé très hydrophile, est prépondérant.

1.2. Conjugaison

Avant d'être excrétés par les hépatocytes, les acides biliaires sont en majorité (98%) conjugués à des résidus amines (taurine ou glycine) conduisant respectivement à la production des sels biliaires tauro ou glyco-conjugués (Russell, 2003). Ces derniers acquièrent ainsi une structure physico-chimique de type amphipatique ; ils possèdent à la fois un groupement hydrophile et un groupement hydrophobe à l'origine de leur propriété émulsifiante. La réaction de conjugaison est catalysée par les enzymes *Bile Acid:CoA Synthase* (Bacs) et *Bile Acid:Amino acid Transferase* (Baat), toutes deux exprimées dans les hépatocytes (Falany et al., 1994). La proportion entre glyco et tauro-conjugués dépend de la disponibilité de chacun des acides aminés ; la conjugaison aux résidus glycine demeure majoritaire en condition physiologique (75% du pool d'acides biliaires conjugués) (Humbert et al., 2012). Au pH physiologique, les acides biliaires seront complexés avec des ions sodium ; ils portent alors le nom de « sels biliaires ».

Les acides biliaires primaires traversent la membrane canaliculaire des hépatocytes avec le soutien des transporteurs actifs spécialisés Bsep/Abcb11 (*Bile salt export pump*) et Mrp2/Abcc2 (*Multidrug resistance protein type 2*), membres de la famille des transporteurs ABC (*ATP-Binding Cassette 11*) (Akita et al., 2001, Gerloff et al., 1998). Cette excrétion est accompagnée de celle des autres constituants de la bile : cholestérol et phospholipides (phosphatidyl-choline essentiellement) seront pris en charge respectivement par les transporteurs Abcg5/8 et Mdr3/Abcb4 (*multi drug resistance*) (Smit et al., 1993, Kidambi and Patel, 2008).

Stockés au niveau de la vésicule biliaire, les acides biliaires primaires sont déversés lors du repas au sein du duodénum. La contraction de la vésicule biliaire est sous la dépendance de l'action de la cholécystokinine (Cck), hormone libérée par les cellules neuroendocrine de l'intestin en présence des graisses et des protéines alimentaires (Marciani et al., 2013). Au contact des lipides, les sels biliaires s'organiseront sous la forme de micelles. Cette structure facilite l'action des lipases et le passage des composés lipidiques simples à travers la barrière intestinale (triglycérides, vitamines liposolubles, cholestérol).

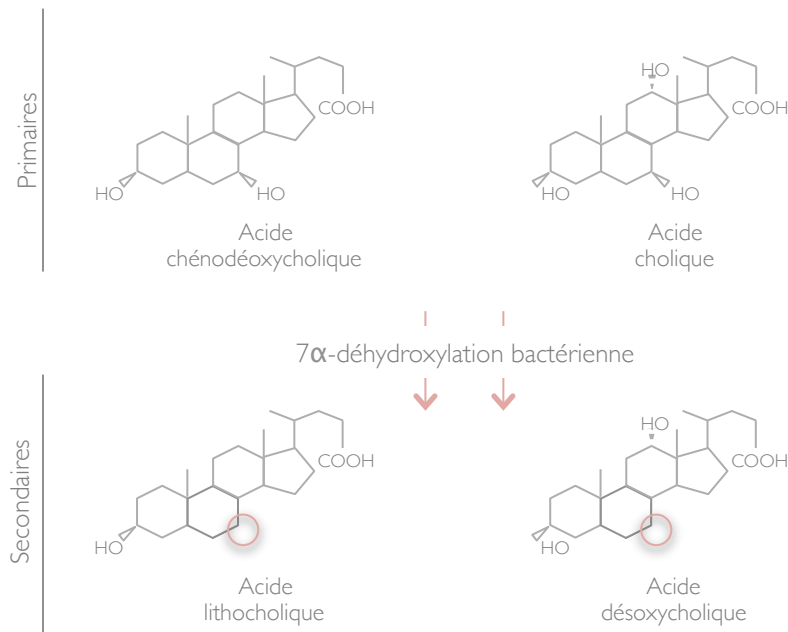


Figure 22. Conversion des acides biliaries primaires en secondaires.

Dans l'intestin, les acides biliaries primaires, l'acide cholique et l'acide chénodésoxycholique sont partiellement déconjugués. Ils seront alors pris en charge par les bactéries de la flore intestinale. L'intervention de la 7α -déshydroxylase bactérienne conduira à leur conversion en acides biliaries secondaires, l'acides désoxycholique et l'acide lithocholique.

2. Synthèse des acides biliaires secondaires

Dans l'iléon les acides biliaires sont partiellement déconjugués et modifiés par l'action d'enzymes de la flore intestinale (Figure 22) (Ridlon et al., 2006). Cette transformation aboutit à la synthèse des acides biliaires qualifiés de secondaires : ainsi, l'acide déoxycholique (DCA) et l'acide lithocholique (LCA) proviennent respectivement de la conversion du CA et du CDCA par l'enzyme *7 α -deshydroxylase* bactérienne. Les acides biliaires secondaires possèdent des propriétés détergentes et donc une toxicité plus importante que les acides biliaires primaires (Monte et al., 2009).

A la suite des différentes transformations effectuées lors du cycle entéro-hépatique une large variété d'acides biliaires se retrouve accumulée au niveau du tractus digestif. Tous présentent des propriétés physico-chimiques distinctes ; leur association permet l'émulsion de graisses (Monte et al., 2009).

3. Cycle entéro hépatique

Au sein de l'iléon ou du colon, la majorité des acides biliaires (95%) est réabsorbée pour être reconduite au niveau hépatique par la circulation portale (Figure 23) ; les 5% éliminés par les fèces seront compensés par la synthèse *de novo* afin de maintenir un pool constant d'acides biliaires (Hofmann, 1999).

Au niveau de l'iléon terminal, les acides biliaires primaires sont réabsorbés de manière active dans les entérocytes par le transporteur *Asbt/Slc10a2 (Apical sodium-dependent bile acid cotransporter)* (Craddock et al., 1998). Ils seront pris en charge par la protéine de liaison cytosolique *Ibabp (Ileal bile acid binding protein)* et conduit jusqu'à la membrane baso-latérale des entérocytes. Le transporteur hétéromérique *Osta/ β (Organic solute transporter)* permettra leur excrétion dans la veine porte (Seward et al., 2003). La majorité des acides biliaires non absorbés est convertie en dérivés secondaires. Plus hydrophobes, ces derniers traverseront la barrière entérocytaire par diffusion passive majoritairement au niveau du colon.

De retour au foie, les acides biliaires regagnent les hépatocytes par l'intermédiaire des transporteurs *Ntcp/Slc10a1 (Na⁺-dependent Taurocholate Cotransport Peptide)*, *Oatp1b1* et *Oatpb3 (Organic anion transporter)* présents au pôle sinusoidal (Dawson et al., 2009, Hagenbuch and Meier, 1994). Ils pourront à nouveau être excrétés du côté canaliculaire lors d'un second cycle de digestion. Le pool d'acides biliaires subit ainsi 4 à 12 cycles entéro-hépatiques par jour.

Au pôle sinusoidal un système d'efflux des acides biliaires est également présent. Il met en jeu

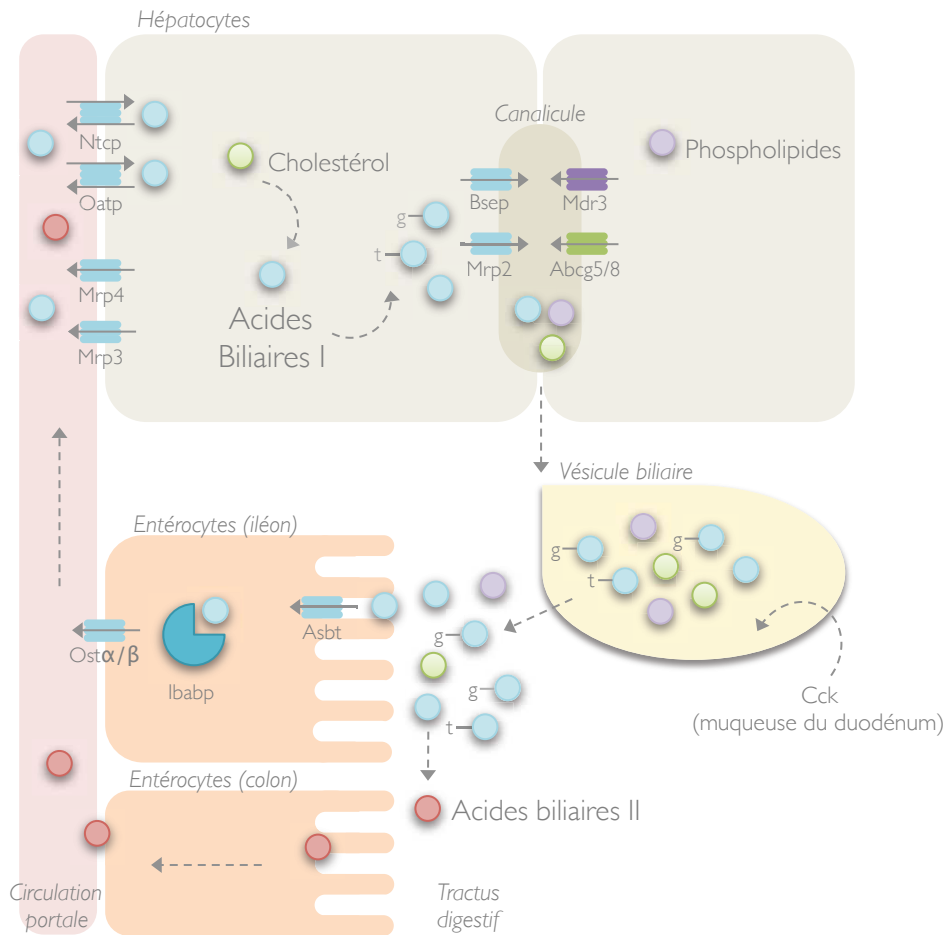


Figure 23. Représentation schématique du cycle entéro-hépatique des acides biliaires chez la souris.

Les acides biliaires primaires néo-synthétisés dans le foie sont pour la majorité conjugués avec le glyco (g) ou la tauro (t) par les enzymes Bacs et Baat. Les transporteurs de la super-famille des ABC permettent la sécrétion des constituants de la bile au pôle canaliculaire des hépatocytes. Ces derniers seront stockés dans la vésicule biliaire. Lors du repas, la libération de la Cck par les cellules neuroendocrines du duodénum permet la contraction des fibres musculaires de la vésicule biliaire. Les acides biliaires sont alors déversés dans le tractus digestif où ils participeront à l'émulsion et à la solubilisation des lipides alimentaires. Dans l'iléon, les bactéries de la flore permettent la conversion des acides biliaires primaires en acides biliaires secondaires. La majorité d'entre eux sera réabsorbée et transportée par la veine porte jusqu'au foie. Captés au pôle basal des hépatocytes, ils participeront à un nouveau cycle de digestion. L'excès d'acides biliaires est éliminé par les fèces.

Bacs, *Bile acid:CoA synthase* ; Baat, *Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase* ; Bsep, *bile salt export pump* ; Mrp, *multidrug-resistance protein* ; Mdr3, *multidrug resistance P-glycoprotein type 3* ; Ibabp, *ileal bile acid binding protein* ; Ntcp, *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide* ; Oatp, *organic anion transporter* ; Ostα/β, *organic solute transporter α/β* ; Asbt, *Apical sodium bile acid transporter* ; Cck, *cholecystokinin*

les transporteurs Mrp3/Abcc3 et Mrp4/Abcc4. Peu exprimés en conditions physiologiques, ces derniers ne sont induits qu'en cas de pathologie biliaire lorsque l'accumulation des acides biliaires dans les hépatocytes devient trop importante (Zollner et al., 2003, Wagner et al., 2003).

Le bon déroulement du cycle entéro-hépatique des acides biliaires est sous la dépendance de multiples régulations visant à assurer le maintien de leur l'homéostasie des acides biliaires mais également celui du cholestérol dont ils sont issus. Ceci implique une régulation coordonnée de la synthèse, du transport et de l'élimination des acides biliaires. Cette régulation est en partie conduite par les acides biliaires eux mêmes au travers leur activité de molécules de signalisation.

B. Les acides biliaires, molécules de signalisation cellulaire

Les acides biliaires possèdent des propriétés de molécule de signalisation par l'activation de récepteurs aux propriétés distinctes ; parmi eux le récepteur nucléaire Fxr α et le récepteur membranaire Tgr5 (GpbarR1, *G protein-coupled bile acid receptor*) participent à la régulation du cycle entéro hépatique des acides biliaires, mais aussi des métabolismes glucidique, lipidique et énergétique. Ils permettent également la modulation des processus liés à l'inflammation et à l'immunité.

Les acides biliaires sont également capables d'induire l'activation des récepteurs Pxr (*Pregnane x receptor*) (Staudinger et al., 2001), Car (*Constitutive androstane receptor*) ou Vdr (*Vitamin d receptor*) (Makishima et al., 2002). Ces récepteurs sont principalement impliqués dans la régulation des mécanismes de détoxications des acides biliaires ainsi que d'élimination de polluants ou xénobiotiques (Staudinger et al., 2001, Xie et al., 2001, Sonoda et al., 2002).

1. Le récepteur nucléaire des acides biliaires : Fxr α

Premier récepteur identifié comme médiateur de la signalisation « acide biliaire », le récepteur Fxr α a un rôle prépondérant dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol et du métabolisme des acides biliaires.

1.1. Généralités

Fxr α appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il fût isolé pour la première fois à partir de foie de souris dans le cadre de la recherche d'interacteurs du récepteur aux acides rétinoïques Rxr α (*Retinoid x receptor-alpha*) ce qui lui a valu l'appellation initiale de *Rxr-interacting-protein-14* (RIP14) (Seol et al., 1995). Ce n'est que plus tard, lors de la caractérisation du farnésol comme ligand,

que la dénomination Fxr α pour *Farnesol-X-Receptor* lui a été attribuée (Makishima et al., 1999, Parks et al., 1999, Wang et al., 1999).

Le gène *Fxr α* code, chez l'humain comme chez la souris, quatre isoformes (Fxr α 1-2-3 et 4), issus de l'épissage alternatif du transcrit *Fxr α* (Huber et al., 2002). Ces derniers diffèrent par leur potentialité transactivatrice *in vitro* ainsi que par leur distribution tissulaire (Zhang et al., 2003, Lee et al., 2001, Lee et al., 2005). Le rôle de chacune des isoformes ne sera pas abordé ici et le terme Fxr α désignera de manière générale l'ensemble des quatre isoformes.

Fxr α est largement exprimé au sein des tissus impliqués dans le cycle entéro-hépatique des acides biliaires ; on le retrouve particulièrement dans l'iléon ou le foie (Zhang et al., 2003). Il est également retrouvé exprimé dans le rein, la glande surrénale, le testicule et à un moindre niveau dans le tissu adipeux où son rôle demeure à ce jour méconnu.

Le récepteur Fxr α appartient à la famille des récepteurs nucléaires. Il en possède la structure caractéristique : 1) en N-terminal, le domaine AF1 permet le recrutement des co-activateurs indépendamment de la présence du ligand ; 2) le domaine central porte le domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA Binding Domain*) ; 3) le domaine charnière permet le recrutement des corépresseurs en l'absence de ligand ; 4) en C-terminal, on retrouve le site d'hétéro-dimérisation, le domaine de liaison au ligand (LBD, *Ligand Binding Domain*) ainsi que le domaine AF2 nécessaire au recrutement des co-activateurs en réponse à la fixation du ligand (Viennois et al., 2011).

Au sein de ses tissus cibles, Fxr α forme un hétérodimère obligatoire avec le récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis, Rxr. L'hétérodimère Rxr/Fxr α est capable de se lier à une séquence consensus sur le promoteur de ses gènes cibles. Cette dernière comporte deux séquences répétées inversées de type IR1 (*Inverted repeat 1*) (AGGTCAnACTGGA) (Laffitte et al., 2000). L'activation du complexe par les ligands respectifs de chacun des deux récepteurs conduit à un changement conformationnel de l'hétérodimère. Ceci permet la libération de co-represseurs (NCor, *nuclear corepressor*) au profit du recrutement de co-activateurs tels que Pgc1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) ou Src1 (*Steroid receptor coactivator 1*) (Downes et al., 2003, Zhang et al., 2004) ; la transcription des gènes cibles est alors initiée. Fxr α est également présent sur certains promoteurs de gènes sous la forme de monomère ou d'homo-dimère. Bien que peu décrit, Fxr α jouerait dans cette configuration le rôle de répresseur transcriptionnel (Claudel et al., 2002, Claudel et al., 2005).

Chez l'Homme, la séquence génomique de *FXR α* semble relativement stable et peu de variants ont été à ce jour mis en évidence. Quatre d'entre eux (-1g>t, M1V, W80R, M173T) ont pu

cependant être associés chez la femme à une prédisposition au développement de cholestases gestationnelles (ou cholestase gravidique) (Van Mil et al., 2007). D'autre part, un haplotype de *FXRα* (HNR1_1) retrouvé dans la population mexicaine, est associé au développement de pathologies lithiasiques (calculs biliaires) (Kovacs et al., 2008).

L'affinité relative des ligands de *Fxrα* est déterminée généralement par des méthodologies de type FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*) ou de gène rapporteur dans des systèmes cellulaires artificiels exprimant de manière ectopiques les constructions d'intérêt. Il est donc difficile d'extrapoler les conclusions de ces études à un système *in vivo*. D'autre part, selon le protocole utilisé, toutes ne concluent pas à des valeurs d'EC50 identiques pour chacun des ligands testés. Néanmoins, l'ordre relatif de leur affinité demeure cohérent. Les ligands naturels connus de *Fxrα* sont par ordre d'affinité le CDCA, le LCA = DCA, et le CA (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Yu et al., 2002) (Pellicciari et al., 2004). Il est à noter que les formes glyco- et tauro-conjugués du CDCA, DCA et LCA ont un pouvoir agoniste préférentiel vis-à-vis de *Fxrα* comparé à leur forme native respective (Campana et al., 2005).

Des ligands semi-synthétiques de *Fxrα* ont été développés à partir de la structure du CDCA afin d'améliorer ses propriétés agonistes. Parmi ces derniers, le 6α-éthyl-CDCA, connu sous la terminologie INT-747, possède une affinité supérieure à celle du CDCA (EC50 = 90nM) (Pellicciari et al., 2009). Le GW4064 est un agoniste synthétique couramment utilisé en expérimentation *in vitro* ou *in vivo*. Il présente une affinité élevée pour *Fxrα* de l'ordre du nano-molaire (0,99-2 nM), soit 1000 fois supérieure à celle du ligand naturel CDCA (Feng et al., 2009). *Fxrα* possède également un antagoniste naturel issu de plante ; la guggulstérone est extraite de *Commiphora mukul* (Urizar and Moore, 2003; Wu et al., 2002). Son administration à des souris nourries par un régime riche en graisse prévient l'accumulation de cholestérol hépatique en favorisant la synthèse des acides biliaires (Urizar et al., 2002).

1.2. Rôles physiologiques

1.2.1. *Fxrα* et acides biliaires

L'étude d'un modèle murin invalidé pour le gène codant *Fxrα* (souris *Fxrα*^{-/-}), a permis de mettre en évidence l'implication de *Fxrα* dans la régulation du cycle entéro-hépatique et dans la régulation de la biosynthèse des acides biliaires (Sinal et al., 2000). Les souris *Fxrα*^{-/-} adultes présentent de forts taux plasmatiques d'acides biliaires consécutifs à des troubles du rétrocontrôle de leur synthèse hépatique (Anakk et al., 2011, Sinal et al., 2000). Les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénotype ont été définis (Figure 24).

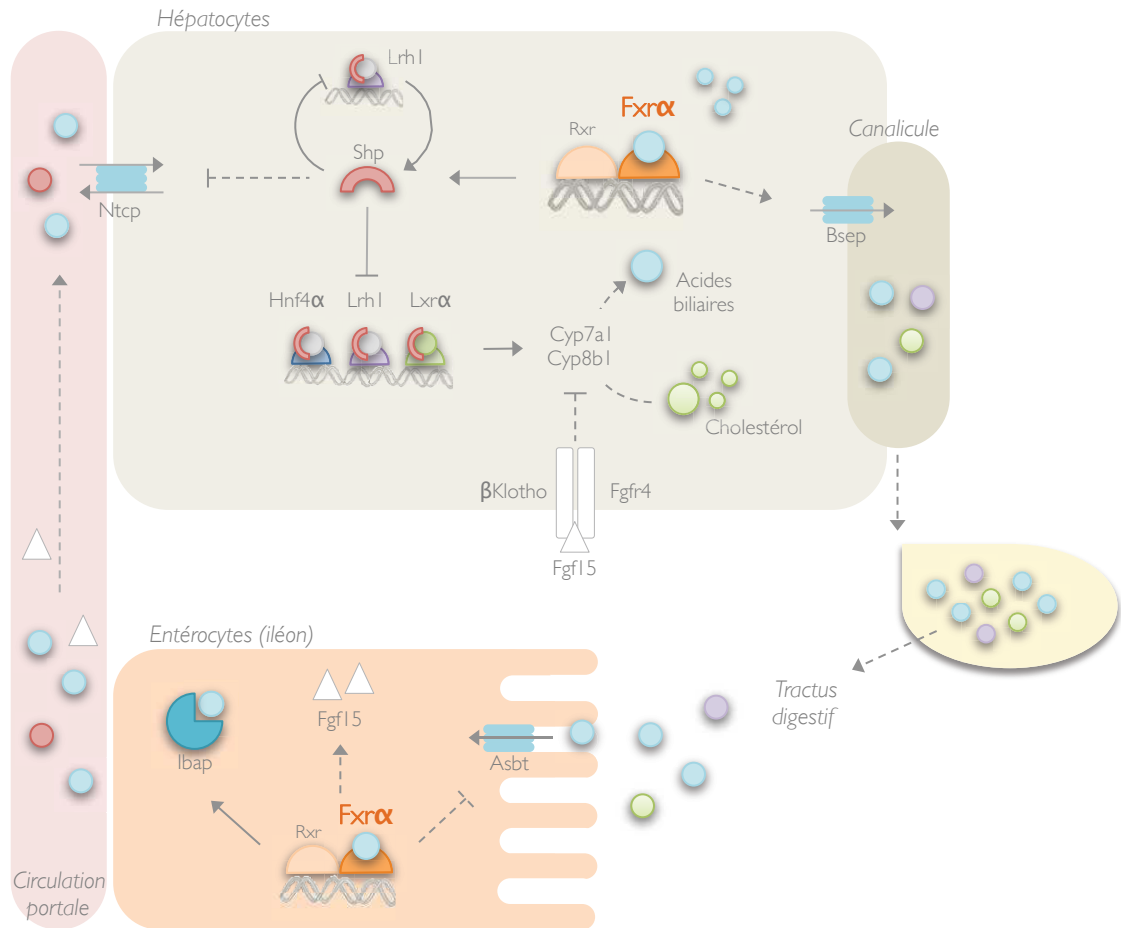


Figure 24. Représentation schématique du cycle entéro-hépatique des acides biliaires chez la souris.

Fxrα est responsable du rétro-contrôle de la synthèse des acides biliaires à 2 niveaux. Dans le foie, son activation par les acides biliaires induit l'expression de *Shp* qui, en retour, inhibe l'activité transactivatrice des facteurs de transcription présents sur le promoteur des gènes *Cyp7a1* et *Cyp8b1*, acteurs majeur de la synthèse des acides biliaires. Dans les entérocytes, l'activation de Fxrα par les acides biliaires induit la synthèse et la libération de l'hormone Fgf15. Conduite jusqu'au foie, elle active les récepteurs Fgfr4 et β-Klotho ce qui conduit à la répression de l'expression de *Cyp7a1* et *Cyp8b1*. Parallèlement, Fxrα protège le foie de l'accumulation toxique des acides biliaires. Il participe à leur efflux en prenant en charge la transcription du transporteur *Bsep* et en limite l'import en réprimant l'expression de *Ntcp*. Dans les entérocytes, Fxrα limite le retour hépatique en réprimant l'expression du transporteur membranaire *Asbt*. Parallèlement, l'induction de l'expression de *Ibap* protège les entérocytes de la toxicité des acides biliaires.

Fxrα, *Farnesoid x receptor alpha* ; Rxr, *Retinoid x receptor* ; Asbt, *Apical sodium bile acid transporter* ; Ibap, *Ileal bile acid binding protein* ; Bsep, *Bile salt export pump* ; Ntcp, *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide* ; Shp, *Short heterodimer partner* ; Hnf4α, *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha* ; Lrh1, *Liver receptor homolog-1* ; Lxrα, *Liver x receptor alpha* ; Fgf15, *Fibroblast growth factor 15-19* ; Fgfr4, *Fibroblast growth factor receptor 4*

Chez la souris, l'activation de Fxr α au niveau du foie est responsable de la répression de l'expression des gènes codant Cyp7a1 et Cyp8b1, enzymes clefs de la biosynthèse des acides biliaires primaires. Ce mécanisme fait intervenir différents intermédiaires, membres de la superfamille des récepteurs nucléaires. Le récepteur orphelin Shp, cible transcriptionnelle de Fxr α interfère avec l'action du facteur de transcription Lrh1, impliqué dans l'induction de l'expression de Cyp7a1 (Lu et al., 2000, Goodwin et al., 2000). De la même manière, la voie Fxr α /Shp bloque la transactivation du récepteur nucléaire Hnf4 α sur le promoteur de Cyp8b1 (Zhang and Chiang, 2001).

L'action hépatique de Fxr α pour la régulation de la synthèse des acides biliaires est complétée au niveau intestinal par l'induction du facteur de croissance Fgf15 chez la souris (Holt et al., 2003). Exprimé dans les cellules épithéliales iléales en réponse à l'activation par les acides biliaires de Fxr α , Fgf15 est acheminé jusqu'au foie par la veine porte et agit de manière endocrine sur les hépatocytes en activant son récepteur Fgfr4 (*Fibroblast growth factor receptor 4*) (Holt et al., 2003; Inagaki et al., 2005). L'activation de Fgfr4 requiert la présence de son partenaire, la protéine β -Klotho, et conduit à la répression de l'expression de Cyp7a1, probablement par l'intermédiaire des voies Erk et Jnk (*Extracellular signal-regulated kinases, c-jun nh(2)-terminal kinase*) (Ito et al., 2005, Kong et al., 2012). Récemment, les travaux publiés par l'équipe de Moschetta montrent que la réexpression intestinale de Fxr α chez des souris Fxr α -/- suffit à restaurer le rétrocontrôle de la synthèse hépatique (Degirolamo et al., 2014).

En parallèle, Fxr α protège le foie des effets toxiques de l'accumulation des acides biliaires. Son activation diminue leur import au sein des hépatocytes en réprimant, *via* Shp, l'expression du transporteur sinusoïdal Ntcp (Denson et al., 2001). De plus, l'activation de Fxr α favorise l'excrétion des acides biliaires dans les voies biliaires par l'induction transcriptionnelle du transporteur Bsep (Wagner et al., 2003). Cet effet est mis en relation avec la diminution de l'excrétion au sein du tractus digestif des acides biliaires chez les souris invalidées pour Fxr α (Sinal et al., 2000). Dans les hépatocytes, Fxr α augmente l'expression des gènes codants les protéines de détoxification des acides biliaires telles que Cyp3a11 et Ugt2b4 (*UDP-GlucuronylTransferase 2B*). Dans les entérocytes, l'expression du transporteur membranaire Asbt et de la protéine cytosolique Ibabp est régulée sous la dépendance de Fxr α (Neimark et al., 2004, Hwang et al., 2002).

1.2.2. Fxr α et triglycérides

Fxr α est également impliqué dans le contrôle du métabolisme lipidique au niveau hépatique (Figure 25 A.) (Claudel et al., 2005). Son action limite la synthèse des triglycérides *via* l'inhibition, par Shp, de l'activité transactivatrice du facteur de transcription Srebp1c (*Sterol regulatory element binding protein-1c*), régulateur majeur des enzymes du métabolisme des acides gras ; parmi ces

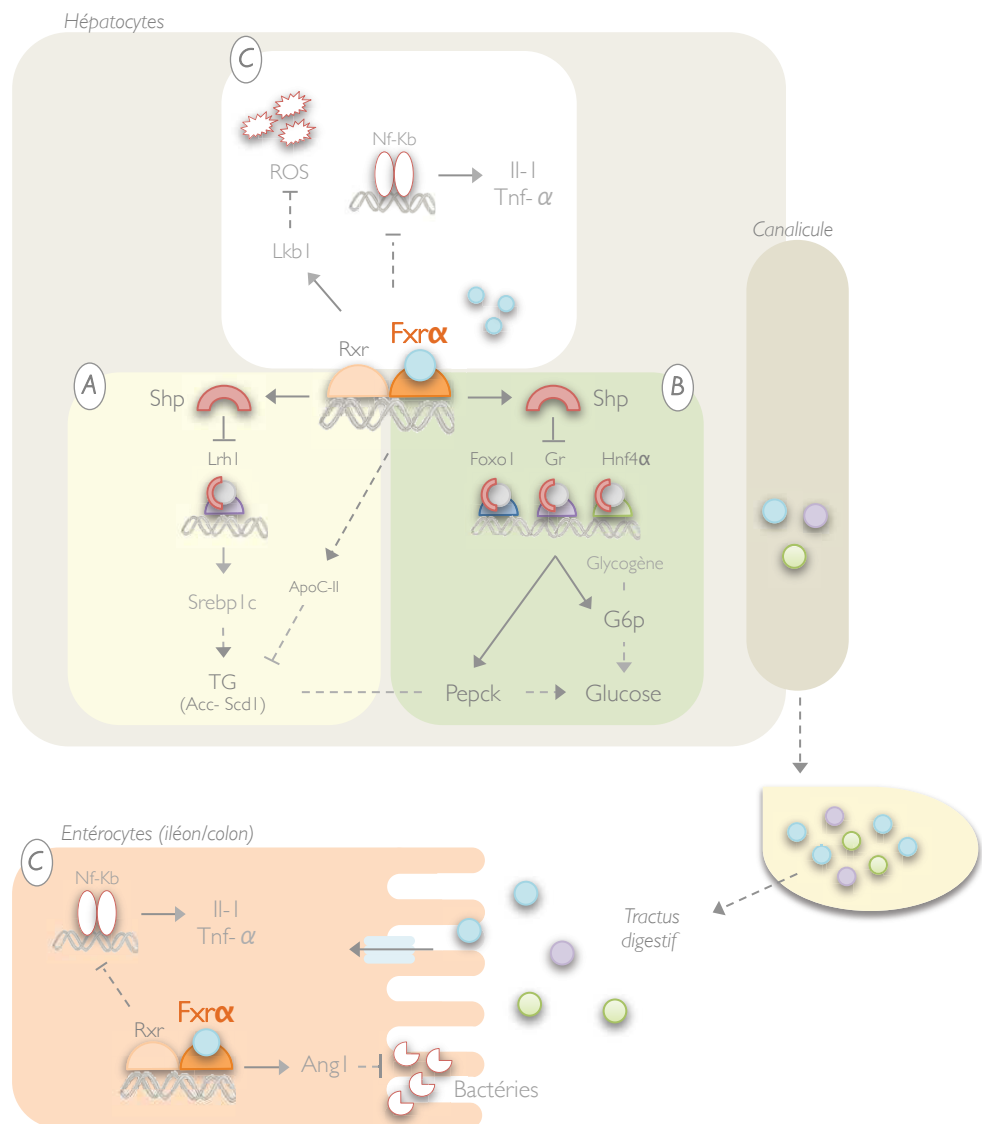


Figure 25. Fxrα : fonctions physiologiques.

A, Fxrα limite la synthèse des triglycérides. Dans le foie, l'induction de *Shp* par Fxrα réprime l'activité transactivatrice de *Srebp1c*, acteurs clef régulant positivement les enzymes de la synthèse des triglycérides (*Acc*, *Scd1*). De plus, Fxrα favorise l'hydrolyse des lipoprotéines VLDLs par l'induction de la lipoprotéine lipase *ApoC-II*. B, Fxrα réprime la néoglucogénèse et la glycogénolyse. L'induction de *Shp* par Fxrα favorise la répression de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription *Foxo1*, *Gr* et *Hnf4α* sur le promoteur des enzymes *Pepck* et *G6p*. C, Fxrα rôle anti-inflammatoire. Dans le foie ou les entérocytes Fxrα réprime l'activité de *Nf-κB* sur le promoteur des cytokines inflammatoires *Il-1* et *Tnf-α*. Dans le foie, Fxrα induit l'expression de *Lkb-1* et réduit la génération de ROS. Dans les entérocytes, l'induction de la transcription de l'*Ang1* par Fxrα favorise la défense microbienne.

Fxrα, *Farnesoid x receptor alpha* ; Rxr, *Retinoid x receptor* ; Shp, *Short heterodimer partner* ; Hnf4α, *Hepatocyte nuclear factor 4 alpha* ; Lrh1, *Liver receptor homolog-1* ; Nf-KB, *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* ; Scd-1, *Stearoyl coenzyme A desaturase 1* ; Acc, *Acétyl-CoA carboxylase* ; TG, triglycérides ; Pepck, *Phosphoenolpyruvate-carboxykinase* ; G6p, *Glucose-6-phosphatase* ; Gr, *glucocorticoid receptor* ; Foxo1, *Forkhead box protein O1* ; Srebp1c, *Sterol regulatory element-binding protein-1c* ; ApoC-II, apolipoprotéine CII ; Il-1, *Interleukine 1* ; Tnf-α, *Tumor necrosis factor alpha* ; Ang1, *Angiogenine 1* ; Lkb1, *Liver kinase B1*

dernières l'Acc (*Acetyl-coA synthase*) ou encore Scd1 (*Stearoyl coenzyme A desaturase 1*) sont impliquées dans la production des acides gras mono-insaturés (Watanabe et al., 2004b, Horton et al., 2002). En plus de limiter la lipogenèse, Fxr α contrôle également le métabolisme des lipoprotéines et favorise l'hydrolyse des VLDLs (*Very Low Density Lipoprotein*) par l'induction transcriptionnelle de l'activateur des lipoprotéines lipases Apoc-II (*Apolipoprotéine c II*) (Kast et al., 2001). Cet effet est confirmé par l'observation, chez les souris Fxr α -/- de fortes concentrations plasmatiques en triglycérides et de leur accumulation au niveau hépatique conduisant à la stéatose (Watanabe et al., 2004b). Une récente étude vient illustrer une fois de plus le rôle protecteur de l'activité de Fxr α vis-à-vis de l'hypertriglycéridémie et de la stéatose. Les souris *Hrn* (*Hepatic p450 reductase null mice*), invalidées pour les cytochromes hépatiques, présentent des niveaux faibles d'acides biliaires et une stéatose liée à l'accumulation des triglycérides (Kunne et al., 2014). Le traitement de ces souris par un régime supplémenté en acide obéticholique, ligand spécifique de Fxr α , améliore le phénotype hépatique et réduit les niveaux de VLDLs plasmatiques. Par ailleurs, plusieurs acides biliaires de synthèses, ligands agonistes de FXR α , ont déjà été développés dans le but de lutter contre les hypertriglycéridémie chez l'Homme. Aussi, l'acide obéticholique est aujourd'hui en cours de phase de test clinique II pour le traitement de la stéatose hépatique non alcoolique (NASH) (Adorini et al., 2012). Principale étiologie de la cirrhose hépatique, cette maladie touche aujourd'hui près 5% des populations nord américaines et européennes (Ong and Younossi, 2007).

1.2.3. Fxr α et glucides

Au niveau hépatique, Fxr α régule le métabolisme glucidique (Figure 25 B.). Dans le foie, l'activation de Fxr α par les acides biliaires ou le GW4064 diminue l'expression de *Pepck* (*Phosphoenolpyruvate-carboxykinase*), enzyme clef de la néoglucogenèse ; son action porte également sur l'expression de la G6p (*Glucose-6-phosphatase*), intervenant dans les réactions de glycogénolyse (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). Cette répression fait ici aussi intervenir l'intermédiaire Shp. Fixé à Pgc1 α , il inhibera l'activité transactivatrice des facteurs de transcriptions Gr (*Glucocorticoïde Receptor*), Hnf4 α ou encore Foxo1 sur le promoteur des enzymes hyperglycémiantes (Borgius et al., 2002; Yamagata et al., 2004). Les souris Fxr α -/- présentent une intolérance au glucose accompagnée d'une résistance à l'insuline (Cariou et al., 2006; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). Dans des souris sauvages ou diabétiques (souris *db/db*) l'activation de Fxr α restaure la glycémie. Enfin, l'expression ectopique de Fxr α par un adénovirus dans le foie de souris conduit à une diminution des taux plasmatiques de glucose (Zhang et al., 2006).

1.2.4. *Fxrα et propriété anti-inflammatoire*

Comme souligné précédemment, le rôle hépato-protecteur de Fxrα est attribué à son action centrale pour le maintien de l'homéostasie lipidique (cholestérol et triglycérides) et glucidique. Ces propriétés sont complétées par la mise en évidence de son action anti-inflammatoire (Figure 25 C.). Lors de pathologies hépatiques de type cholestase, Fxrα protégerait les hépatocytes de l'inflammation induite par l'accumulation des acides biliaires (Wang et al., 2008). Dans des lignées d'hépatocytes humains (HepG2) l'activation de Fxrα par ses ligands diminue la fixation de NF-KB (*nuclear factor-kappa B*) sur le promoteur de ses gènes cibles et réduit l'expression de cytokines inflammatoires en réponse au LPS (lipopolysaccharide) (Wang et al., 2008). Fxrα permet également de lutter contre la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) induite par la production d'agents inflammatoires lors de pathologies hépatiques chroniques (Nakamoto and Kaneko, 2003, Kitada et al., 2001). *In vitro* et *in vivo* chez la souris, l'activation de Fxrα par le GW4064 favorise l'activité de Lkb1 (*Liver Kinase B1*), thréonine kinases jouant un rôle clef pour la protection cellulaire en présence de ROS (Lee et al., 2012; Shaw et al., 2005).

L'action immunosuppressive de Fxrα est également identifiée au niveau intestinal et particulièrement dans le colon. Les souris *Fxrα*^{-/-} développent spontanément une inflammation importante de l'épithélium intestinal associée à une forte réponse immunitaire (Yang et al., 2007a, Kim et al., 2007). Dans des modèles murins de colite, les symptômes inflammatoires sont améliorés suite à l'activation de Fxrα par l'administration de ses ligands (Inagaki et al., 2006) (Gadaleta et al., 2011) ; Fxrα limite le recrutement de cellules immunitaires à la muqueuse et préserve l'intégrité de la barrière intestinale (Gadaleta et al., 2011). Dans ce contexte Fxrα permettrait de favoriser l'expression de gènes tels que celui codant l'Angiogénine, impliquée dans la défense anti-microbienne (Inagaki et al., 2006). Aussi, tout comme dans les hépatocytes, l'activation de Fxrα dans les entérocytes interfère également avec l'activité transactivatrice de Nf-Kb pour la production de cytokines en réponse au LPS (Gadaleta et al., 2011).

1.2.5. *Fxrα et hormones stéroïdiennes*

a) *Fxrα et glucocorticoïdes*

Fxrα est retrouvé fortement exprimé dans les cellules de la zone fasciculée de la corticosurrénale où son activation participe à la régulation de la synthèse des corticostéroïdes. Aussi, chez la souris, le traitement par du GW4064 conduit à une élévation des concentrations de corticostérone plasmatique (Hoekstra et al., 2012). Cette dernière est associée dans la surrénale à l'augmentation par Fxrα de l'expression de *Srb-1*, transporteur responsable de l'import du cholestérol (Hoekstra et al., 2012). L'action de Fxrα serait complétée au niveau périphérique par l'augmentation

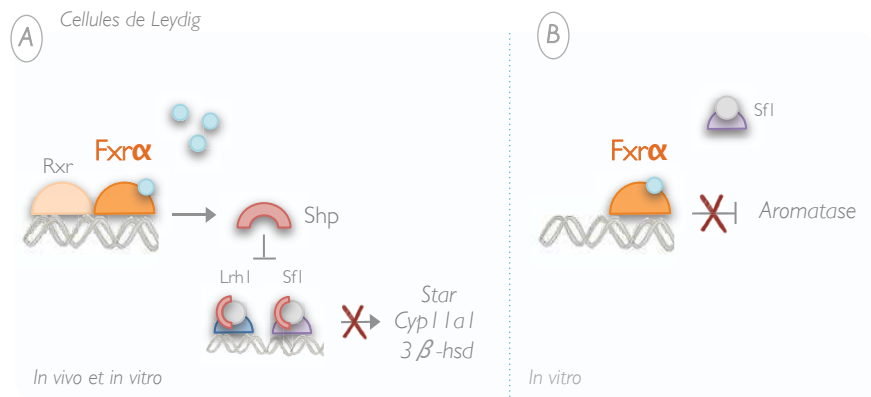


Figure 26. Fxrα et stéroïdogénèse Leydigienne chez la souris

A, Dans les cellules de Leydig, l'induction de *Shp* en réponse à l'activation de Fxrα, conduit à l'inhibition de l'activité transactivatrice des récepteurs Lrh1 et Sf1 sur le promoteur des enzymes stéroïdogènes *Star*, *Cyp11a1* et *3β-hd*. **B,** Dans une lignée de cellules de Leydig tumorales, Fxrα entre en compétition avec Sf1 sur le promoteur de l'*Aromatase* ce qui inhibe son expression.

Fxrα, *Farnesoid x receptor alpha* ; Rxr, *Retinoid x receptor* ; Shp, *Short heterodimer partner* ; Lrh1, *Liver receptor homolog-1* ; Sf1, *Steroidogenic factor 1* ; *Star*, *Steroidogenic acute regulatory protein* ; *Cyp11a1* (P450scc), *cytochrome P450 side chain cleavage* ; *3βhsd*, *3-beta hydroxysteroid dehydrogenase*

de la biodisponibilité des glucocorticoïdes vis-à-vis de leurs tissus cibles ; aussi, dans des cellules intestinales humaine (Caco-2), FXR α réprime l'expression du gène codant pour l'UGT2B7 considérée comme l'enzyme majeure du catabolisme des hormones stéroïdes surrénaliennes (Lu et al., 2005).

Intégrée au rôle des glucocorticoïdes pour la régulation du métabolisme glucidique, l'activité de Fxr α pourrait favoriser les phénomènes d'adaptation métabolique en réponse au stress (Cassuto et al., 2005; McMahon et al., 1988; Opher et al., 2004). Alors qu'en condition basale son activation au niveau hépatique réprime l'expression des enzymes de la glycogénolyse/néoglucogénèse, Fxr α est indispensable à leur induction en conditions de mise à jeun (Yamagata et al., 2004; Zhang et al., 2006). Au niveau moléculaire, les travaux de Ma *et al.* proposent qu'à l'état de jeûne les niveaux élevés de Fxr α hépatiques permettent sa fixation à des éléments de réponse de faible affinité (type IR8) sur le promoteur du récepteur aux glucocorticoïdes *Gr* favorisant ainsi son expression et permettant de répondre au stress hypoglycémiant par l'induction des enzymes telles que la Pepck ou la G6p (Ma et al., 2006).

b) Fxr α et hormones sexuelles

i Fxr α et androgènes

En 2007, les travaux de Volle *et al.* ont mis, pour la première fois, en évidence la présence de Fxr α au sein de l'espace interstitiel du testicule de souris, suggérant son implication dans le contrôle de la synthèse des stéroïdes testiculaires (Volle et al., 2007). Alors que les souris Fxr α -/- mâles ne présentent aucune modulation des concentrations de testostérone plasmatique, l'induction de Fxr α chez des souris sauvages se traduit par une diminution de la production d'androgènes et ce indépendamment de l'axe hypothalamo-hypophysaire. Cette observation est associée, 12h après l'injection de GW4064, à la diminution de l'expression testiculaire des gènes codant pour les enzymes principales de la stéroïdogénèse *Star*, *Cyp11a1* et *3- β hsd*. Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce phénomène ont été décrits (Figure 26) ; l'activation de Fxr α dans les cellules de Leydig induit la transcription du gène codant pour le récepteur orphelin *Shp*. Celui-ci inhibe en retour les activités transactivatrices des récepteurs nucléaires Lrh-1 et Sf-1 sur le promoteur des gènes stéroïdogènes.

L'ensemble de ces données soulève plusieurs interrogations quant à la signification physiologique que pourrait porter l'action répressive de Fxr α vis-à-vis de l'homéostasie des androgènes. Cette question est soutenue par le fait que l'androstérone, intermédiaire de la synthèse des stéroïdes est capable, *in vitro*, de lier Fxr α et d'en induire l'activation (Wang et al., 2006a). Dans ce contexte l'hypothèse selon laquelle Fxr α pourrait contribuer au rétrocontrôle de la stéroïdogénèse et réguler localement l'équilibre de la synthèse de la testostérone reste à définir.

Par ailleurs, il est important de considérer les conséquences que pourrait engendrer l'activation aberrante de Fxr α dans le cadre de conditions pathologiques. Cette question est d'autant plus intéressante que l'on sait que lors de cholestase chez l'homme, l'augmentation des concentrations d'acides biliaires plasmatiques est associée à une diminution des concentrations plasmatiques d'androgènes.

ii Fxr α et oestrogènes

Les travaux de Catalano menés *in vitro* suggèrent l'implication de Fxr α pour la répression de la synthèse des oestrogènes testiculaires (Figure 26). Activé dans des cellules de Leydig tumorales par le GW4064 ou le CDCA, Fxr α entre en compétition avec Sf-1 sur le promoteur de l'*Aromatase* et réduit ainsi son expression (Catalano et al., 2010). La validité de ce mécanisme *in vivo* reste à ce jour à démontrer. Ceci est d'autant plus vrai que d'autres travaux montrent qu'à l'inverse FXR α possède dans des lignées cellulaires humaines de cancer du sein, des propriétés pro-oestrogéniques favorisant leur capacité proliférative (Journe et al., 2008). Dans ce contexte, les auteurs décrivent une interaction physique de FXR α avec le récepteur ER α ; celle-ci favoriserait, en l'absence d'oestrogènes, les propriétés transactivatrices de ER α pour l'induction de l'expression de ses gènes cibles. La signification clinique de ce mécanisme est soutenue par des données épidémiologiques décrivant une corrélation positive entre les niveaux d'accumulation de FXR α et les taux de prolifération de tumeurs mammaires de femmes présentant de faibles concentrations d'oestrogènes (femmes post-ménopausées) (Journe et al., 2009).

2. Le récepteur membranaire des acides biliaires : Tgr5

Le récepteur Tgr5, membre de la classe 1 des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), est aussi connu sous l'appellation Gpbar-1. Initialement identifié comme récepteur orphelin, il est aujourd'hui reconnu comme le récepteur membranaire des acides biliaires (Maruyama *et al.*, 2002).

2.1. Généralités

Tgr5 fut identifié pour la première fois dans le cadre de la recherche *in silico* de nouveaux GPCRs (Récepteurs couplés aux protéines G) sur la base de leur homologie de séquence en acides aminés. Cette stratégie a conduit en 2002 et 2003 à l'isolation du gène codant *TGR5/Tgr5* par les travaux de Maruyama (Maruyama et al., 2002) et Kawamata (Kawamata et al., 2003). Chez l'Homme, *TGR5* est codé par un gène unique constitué de 2 exons ; l'homologue murin n'en présente qu'un. Peu de polymorphismes du gène codant *TGR5* ont à ce jour été mis en évidence chez l'homme. Le variant SNP annoté rs1155482 conduit à la perte de fonction de signalisation du récepteur. Sa présence a pu

être associée au développement de pathologies inflammatoires des voies biliaires (cholangite sclérosante primitive) (Hov et al., 2010).

Tgr5 est une protéine de 35kDa constituée de 7 domaines transmembranaires caractéristiques de la structure des GPCRs (Hov et al., 2010). Sa stimulation en réponse à la fixation de ses ligands est à l'origine de l'activation de l'adénylate cyclase et de l'élévation des concentrations intracellulaires d'AMPc (Kawamata et al., 2003, Zhong, 2010). L'AMPc sera à son tour responsable de l'activation de la Pka. Cette dernière phosphoryle le facteur de transcription Creb qui, activé, induit, l'expression de gènes cibles. Tgr5 peut aussi agir indépendamment de la Pka. Dans des cultures cellulaires de neurones, l'augmentation des concentrations de Ca^{2+} par Tgr5 conduit à la production de ROS (Keitel et al., 2010a). A l'inverse, dans les cellules musculaires lisses de la vésicule biliaire l'activation de Tgr5 diminue les niveaux de Ca^{2+} pourtant essentiels aux phénomènes de contraction cellulaire (Lavoie et al., 2010). Par ailleurs, plusieurs études *in vitro* ont relevé la capacité de Tgr5 à induire l'activation des voies de signalisation Jnk ou Mapk en réponse aux acides biliaires (Yang et al., 2007b, Yasuda et al., 2007). Ces dernières, largement impliquées dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose cellulaire, soulèvent le rôle potentiel de TGR5 dans le développement de cancers. De plus, dans des cellules humaines issues de carcinome oesophagien TGR5 est à l'origine de la production de ROS et de l'augmentation du taux de prolifération (McQuaid et al., 2011).

Les acides biliaires sont aujourd'hui reconnus comme étant les agonistes naturels préférentiels de Tgr5. C'est au moyen de la mesure des concentrations d'AMPc intracellulaires libérées dans des lignées cellulaires (humaines, HEK295 ; ou de rongeur, CHO) transfectées avec un vecteur d'expression *Tgr5*, que l'affinité relative de chaque nature d'acides biliaires a pu être déterminée (Kawamata et al., 2003, Zhong, 2010). Ainsi les acides biliaires secondaires LCA et DCA sont les agonistes les plus efficaces de Tgr5 ; leurs EC50 sont respectivement de 0,53 et 1 μM , tandis que celles des acides primaires CDCA et CA sont de 4,43 et 7,72 μM (Kawamata et al., 2003). De plus, les dérivés tauro-conjugués présentent de manière générale une affinité plus importante pour Tgr5, le tauro-LCA possédant le plus fort pouvoir activateur de toutes les formes d'acides biliaires (EC50 = 0,29 μM). Il est à noter que certains intermédiaires métaboliques stéroïdiens tels que la progestérone ou la pregnandione sont capables d'induire à moindre mesure l'activité de Tgr5.

Depuis sa mise en évidence, plusieurs agonistes spécifiques ont été identifiés et/ou développés dans le but de comprendre les fonctions physiologiques propres à l'activation de Tgr5. Ainsi, l'utilisation de l'analogue semi-synthétique INT-777 (EC50 = 0.82 μM) ou du composé naturel acide oléanolique (EC50 OA = EC50 LCA = 2.25 μM) sont-ils aujourd'hui largement utilisés dans le cadre d'approches pharmacologiques *in vitro* ou *in vivo* (Pellicciari et al., 2009, Sato et al., 2007).

L'expression de *TGR5* est ubiquiste chez l'Homme et chez l'animal avec des niveaux supérieur dans l'épithélium de la vésicule biliaire, de l'intestin (iléon et colon essentiellement), du muscle squelettique ou encore du tissu adipeux brun où il est impliqué dans la régulation de multiples fonctions métaboliques (Vassileva et al., 2006, Maruyama et al., 2006). Il est aussi retrouvé exprimé au sein de différents types cellulaires hépatiques à l'exception des hépatocytes (cellules endothéliales sinusoidales, cellules de Kupffer) (Keitel et al., 2007)(Keitel et al., 2008). Chez l'Homme, *TGR5* est retrouvé dans les cellules immunitaires et particulièrement dans les monocytes (Kawamata et al., 2003). La présence de transcrits *Tgr5* a également été mis en évidence dans le testicule de souris (Vassileva et al., 2006) ; cependant aucune étude n'a permis à ce jour d'identifier le rôle potentiel de *Tgr5* dans la physiologie testiculaire.

2.2. Rôle physiologique

En 2006, la génération de modèles murins invalidés pour le gène codant *Tgr5* (souris *Tgr5*^{-/-}) ont permis d'identifier plusieurs voies métaboliques sous l'influence de son activité (Vassileva et al., 2006, Maruyama et al., 2006).

En condition basale, les souris *Tgr5*^{-/-} ne présentent pas de phénotype apparent. Aucune altération développementale ou atteinte de la fertilité n'est observée ; les analyses biochimiques ne montrent aucune modulation des concentrations plasmatiques de bilirubine, triglycérides, ou glucose (Maruyama et al., 2006). Alors que certaines études mettent en évidence une diminution des concentrations plasmatiques d'acides biliaires chez les animaux *Tgr5*^{-/-} (Maruyama et al., 2006, Li et al., 2011), d'autres montrent que celles-ci sont identiques à celles retrouvées chez les souris sauvages (Vassileva et al., 2006).

2.2.1. *Tgr5* et acides biliaires

Bien que n'ayant jamais été démontré comme exprimé au sein des hépatocytes (Keitel and Häussinger, 2012), *Tgr5* contribue au contrôle du métabolisme des acides biliaires, notamment de part son action au niveau des voies biliaires (Figure 27 A.) (Keitel and Häussinger, 2011).

Chez la souris, l'activation de *Tgr5* par le LCA ou INT-777 conduit à la relaxation des fibres musculaires lisses de la vésicule biliaire (Li et al., 2011). Contrairement au schéma classique de signalisation, *Tgr5* réduit ici les concentrations intra cellulaires de Ca^{2+} ce qui conduit à un défaut de contractilité cellulaire (Lavoie et al., 2010). Son activation excessive en conditions pathologiques pourrait être impliquée dans un défaut de vidange biliaire et participer au développement de maladies inflammatoires des voies biliaires, phénomène associé au développement de cholestases (Jazrawi et

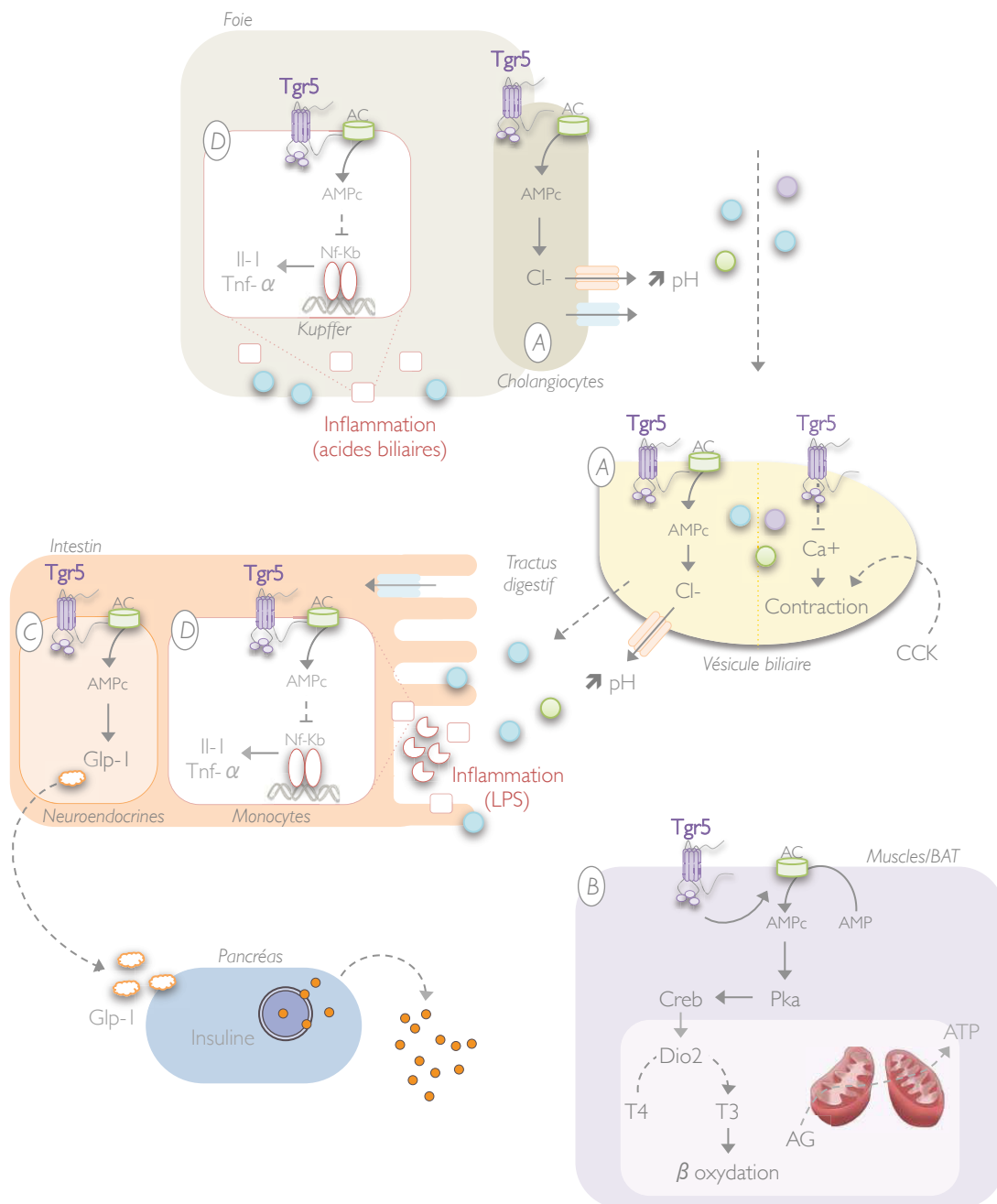


Figure 27. Le récepteur Tgr5 participe au contrôle des métabolismes glucidique et énergétique.

A, Tgr5 et voies biliaires. L'activation de Tgr5 dans les cholangiocytes ou la vésicule biliaire conduit à la libération de Cl⁻ et permet d'augmenter le pH de la bile. Dans les cellules musculaires de la vésicule biliaire, la réduction des concentrations de Ca²⁺ par Tgr5 limite les phénomènes de contraction en réponse à la Cck. **B**, Tgr5 et dépense énergétique. La stimulation de Tgr5 dans le muscle ou la BAT entraîne l'activation de la Pka. La phosphorylation du facteur de transcription Creb induit alors l'expression du gène codant pour l'enzyme Dio2. Cette dernière active l'hormone thyroïdienne T4 qui favorise les réactions de β-oxydation des acides gras. **C**, Tgr5 et glucides. Au niveau des entérocytes, l'accumulation d'AMPc en réponse à Tgr5 permet la synthèse et la libération de l'hormone Glp1. Dans le pancréas, Glp1 favorise la sécrétion d'insuline. **D**, Tgr5 et inflammation. Dans le foie ou les entérocytes Tgr5 limite l'action de Nf-Kb sur le promoteur des cytokines inflammatoires *Il-1* et *Tnf-α*.

AMPc, Adenosine monophosphate cyclique ; Cck, Cholecystokinine ; Nf-Kb, Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells ; Il-1, interleukine 1 ; Tnf-α, Tumor necrosis factor alpha ; Glp-1, Glucagon-like peptide-1 ; Pka, protéine kinase A ; Creb, cAMP responsive element binding protein ; Dio2, Iodothyronine deiodinase 2 ; AG, Acides gras ; ATP, adénosine triphosphate ; BAT, tissu adipeux brun

al., 1995). Chez l'Homme, l'augmentation des niveaux d'expression de TGR5 dans la vésicule biliaire est associée au développement de pathologies lithiasiques (Portincasa et al., 2008). De plus, les souris *Tgr5*^{-/-} sont protégées de la pathologie lorsque celle-ci est induite par un régime riche en cholestérol (Vassileva et al., 2006).

A l'inverse, Tgr5 pourrait protéger les épithélium des voies hépato-biliaires des effets détergents des acides biliaires (Keitel et al., 2014). Exprimé au sein des cholangiocytes et de l'épithélium de la vésicule biliaire, Tgr5 stimule la libération de bicarbonate et augmente le pH de la bile (Keitel et al., 2010b). Les acides biliaires acquièrent alors une nature physico chimique plus hydrophile réduisant leur toxicité ; Tgr5 joue ici un rôle protecteur vis-à-vis de l'inflammation des voies biliaires. Celui-ci est souligné par une récente étude basée sur un modèle de cholestase induite par une hépatectomie partielle chez la souris (Péan et al., 2013). Alors que chez les animaux sauvages l'induction des concentrations plasmatiques et hépatiques d'acides biliaires est compensée dès le jour suivant l'intervention, ces dernières ne seront restaurées que 2 semaines plus tard chez les souris *Tgr5*^{-/-}. L'hypersensibilité à la cholestase des souris *Tgr5*^{-/-} se traduit également par une augmentation plus importante des concentrations d'acides biliaires plasmatiques associée à un défaut d'écoulement de la bile ainsi qu'à une diminution de leur excrétion urinaire. De plus, la nature des acides biliaires est modifiée au profit d'acides biliaires de nature hydrophobe et donc plus toxique, favorisant le développement de phénomènes inflammatoires au niveau des voies biliaires extra et intra-hépatiques.

2.2.2. *Tgr5 et dépense énergétique*

L'implication de Tgr5 dans le contrôle du métabolisme énergétique a été révélée par plusieurs études (Figure 27 B). Les souris *Tgr5*^{-/-} sont prédisposées au développement d'une obésité en réponse à un régime riche en graisse (Maruyama et al., 2006). Les auteurs décrivent une sensibilité particulière des femelles puisqu'à l'état hétérozygote celles-ci présentent une tendance à l'augmentation de leur masse grasse au terme des 9 semaines de traitement. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces observations ont été identifiés par les travaux menés par Watanabe et ses collègues la même année (Watanabe et al., 2006). Le traitement de souris par un régime enrichi en acide cholique restaure l'obésité préalablement induite par un régime riche en graisse. En réponse aux acides biliaires, Tgr5 favorise la dépense énergétique par l'intermédiaire de l'activation de l'hormone thyroïdienne T3 (*tri-iodothyronine*) par l'enzyme Dio2 (*Iodothyronine deiodinase 2*). Cette dernière augmente les réactions de β -oxydation des acides gras au niveau du tissu adipeux brun (chez la souris) ou du muscle squelettique (chez l'homme) favorisant ainsi la conversion des graisses en énergie.

2.2.3. *Tgr5 et glucides*

L'implication de Tgr5 dans la régulation de l'homéostasie glucidique a été mise en avant par le développement de plusieurs modèles transgéniques (Figure 27 C). Les souris surexprimant *Tgr5* présentent une amélioration de leur tolérance au glucose en réponse à un régime diabétogène ; tandis que les souris *Tgr5*^{-/-} montrent des difficultés à restaurer leur glycémie après injection de glucose (Thomas et al., 2008a). Il est toutefois important de noter qu'en physiologie basale aucune différence de glycémie n'est observable entre les souris sauvages et *Tgr5*^{-/-} après mise à jeun (Vassileva et al., 2010). Dans des lignées cellulaires d'entérocytes murins (Stc-1), l'activation de Tgr5 permet la synthèse de l'hormone Glp-1 (*Glucagon-like peptide-1*) (Katsuma et al., 2005). Par son intermédiaire, Tgr5 participe à la libération de l'insuline par le pancréas, et favorise alors la régulation de la glycémie que l'on sait affectée dans des pathologies telles que le diabète de type 2 (Kumar et al., 2012). De même, un traitement par le ligand naturel de Tgr5, l'acide oléanolique, améliore la sensibilité à l'insuline et l'intolérance au glucose chez des souris nourries avec un régime diabétogène (Sato et al., 2007).

Chez l'homme, l'augmentation des concentrations d'acides biliaires est associée à une amélioration du profil glycémique (Adrian et al., 1993, Meyer-Gerspach et al., 2013, Wu et al., 2013). Aussi, chez des patients atteints de syndrome métabolique ayant subi une chirurgie bariatrique, l'augmentation des concentrations d'acides biliaires aux niveau intestinal est associée à l'élévation des concentrations de GLP-1 et à l'amélioration de leur sensibilité à l'insuline (Patti et al., 2009). Récemment, une étude clinique s'est intéressée à l'influence d'un polymorphisme contenu en région 5' du gène TGR5 dans une population d'individus prédisposés au développement de diabète de type 2 (Müssig et al., 2009). Une attention particulière a alors été portée sur le statut métabolique de ces individus. Bien qu'aucune corrélation n'ait pu être établie entre le déclenchement de la pathologie diabétique et la présence du SNP, les auteurs ont relevé une association avec plusieurs paramètres métaboliques tels que des niveaux plus faibles de GLP1. Cette étude soulève ainsi l'intérêt de TGR5 pour une meilleure compréhension des mécanismes de prédisposition au syndrome métabolique et confirme également l'intérêt de son utilisation en tant que cible pharmacologique pour le traitement du diabète. Le développement d'agonistes spécifiques de TGR5 fait l'objet de programme de recherche très suivis au sein des industries pharmaceutiques.

2.2.4. *Tgr5 immunité et inflammation*

Tgr5 est fortement exprimé dans les cellules immunitaires. On le retrouve chez l'homme majoritairement exprimé dans les macrophages et les monocytes CD14⁺. L'implication de Tgr5 dans

le contrôle de l'immunité et de l'inflammation est l'une des premières fonctions à laquelle il fut associé (Kawamata et al., 2003).

Les propriétés anti-inflammatoires de Tgr5 ont été décrites vis-à-vis du foie (Figure 27 D). Les souris *Tgr5*^{-/-} présentent une susceptibilité à l'inflammation et à la nécrose hépatique consécutive à l'injection de LPS (Wang et al., 2011). Ces mêmes observations ont été publiées récemment à partir de différents protocoles de cholestase induite chez des souris sauvages ou *Tgr5*^{-/-} (hépatectomie partielle, ligatures des voies biliaires ou régime supplémenté en CA) (Péan et al., 2013). De plus, l'activation de Tgr5 par ses ligands (t-CA ou acide oléanolique) limite la production de cytokines en réponse au LPS dans des macrophages hépatiques (ou cellules de Kupffer) isolés à partir de foie de rat (Keitel et al., 2008). Cet effet est médié par l'inhibition de la translocation de Nf-Kb au noyau.

Plusieurs études ont permis de révéler ces mêmes propriétés anti-inflammatoires de Tgr5 au niveau intestinal. L'administration de ciprofloxacine ou d'acide oléanolique, ligands de Tgr5, dans un modèle murin de colite conduit à la diminution des signes locaux d'inflammation et réduit l'expression de cytokines telles que Il-6, Tnf α ou Ifn γ . A l'inverse les souris *Tgr5*^{-/-} présentent à 12 mois une histologie du colon anormale caractérisée par une perte d'intégrité de la barrière intestinale (Cipriani et al., 2011). En lien avec un défaut d'expression du transcrit codant la protéine de jonction intercellulaire Zo-1, celle-ci favorise le recrutement de cellules immunitaires et conduit à une réponse inflammatoire excessive.

C. Acides biliaires et physiopathologie

Aux vues de leurs multiples fonctions physiologiques, le maintien de l'homéostasie des acides biliaires joue un rôle capital. Présents en concentrations trop élevées les acides biliaires deviennent détergents et conduisent à la dérégulation des processus physiologiques qu'ils contrôlent par l'intermédiaire de leurs récepteurs (essentiellement Fxr α et Tgr5).

1. Les acides biliaires molécules détergentes

De part leur nature amphipathique, les acides biliaires sont capables d'agir en tant que détergents pour la solubilisation des lipides. A la base de leur fonction digestive, cette propriété physico-chimique est nécessaire à l'émulsion et la solubilisation des graisses alimentaires (Hofmann, 1999; Monte et al., 2009). Cette même propriété peut s'appliquer aux lipides membranaires des cellules exposées de manière chronique à de fortes concentrations d'acides biliaires.

En condition physiologique, les hépatocytes et les cellules endothéliales des voies biliaires sont protégées de l'impact détergent des acides biliaires. Dans la bile, ces derniers s'organisent au contact du cholestérol et des phospholipides sous la forme de micelles mixtes ; leur pouvoir détergent se trouve alors réduit (Monte et al., 2009). L'exemple classique illustrant ce phénomène est fourni par les souris invalidées pour le gène codant Mdr2 (*Mdr2*^{-/-}) chez lesquelles le transporteur canaliculaire assurant la présence de phospholipides dans la bile est absent (Fickert et al., 2004). Ces souris développent une cholangite chronique ressemblant à ce qui est observé dans les maladies inflammatoires des voies biliaires chez l'homme.

Le pouvoir détergent des acides biliaires dépend de leur nature biochimique : les acides biliaires hydrophiles, tels que les sulfo- ou gluco-conjugués, sont considérés comme peu toxiques tandis que les acides biliaires les plus hydrophobes sont les plus détergents (Monte et al., 2009). La cytotoxicité des acides biliaires peut être provoquée par l'induction d'un phénomène de transition de perméabilité des membranes mitochondriales (TPMM) (Botla et al., 1995, Rodrigues et al., 1998). Celui-ci conduit à une dépolarisation du potentiel de membrane associé à un découplage de la chaîne oxydatives et à une crise énergétique aiguë conduisant à la production de ROS. La libération du cytochrome c dans les cellules atteintes engage un processus apoptotique (voie apoptotique intrinsèque). D'autres études menées à partir de cultures d'hépatocytes murins montrent que les acides biliaires sont capables d'induire l'activation du récepteur de mort Fas et des voies de signalisations pro-apoptotiques sous jacentes (Caspase-8, Bid, Bax) (Faubion et al., 1999). Les acides biliaires activent alors les voies apoptotiques dites extrinsèques.

2. Acides biliaires et cancer

Les effets détergents des acides biliaires peuvent conduire à la sélection de cellules résistantes à l'apoptose. Combinés à l'accumulation de ROS et à l'augmentation de dommages à l'ADN, les acides biliaires sont reconnus pour promouvoir la carcinogenèse particulièrement au niveau des tissus du tractus digestif exposés de manière chronique à de fortes concentrations d'acides biliaires. Ceci est par exemple illustré par des études épidémiologiques montrant une corrélation entre des troubles du reflux gastrique et l'augmentation des risques d'adénocarcinomes œsophagiens (Lagergren et al., 1999). Dans ce contexte pathologique, l'action des acides biliaires est médiée par Tgr5 qui, favorisant l'activation du récepteur Egfr (*Epidermal growth factor receptor*), permet l'activation de la voie de signalisation pro-proliférative des Mapks (Hong et al., 2009). Pour une revue exhaustive concernant l'impact carcinogène des acides biliaires se référer à l'article en annexe de ce manuscrit (Baptissart et al., 2013b).

2.1. Catabolisme des acides biliaires

En conditions physiologiques les concentrations d'acides biliaires plasmatiques et tissulaires (foie et intestin essentiellement) sont maintenues à des taux non toxiques. Ceci est le résultat d'une balance finement régulée entre leur synthèse et leur excrétion : c'est le cycle entéro-hépatique. Cependant lorsqu'en conditions pathologiques ces mécanismes de régulation sont altérés ou ne suffisent plus, des systèmes de détoxication sont nécessaires. Ces derniers sont majoritairement pris en charge par le foie, la peau ou les reins. L'élimination des acides biliaires emprunte un procédé catabolique commun à plusieurs molécules incluant les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes, la bilirubine ou plusieurs médicaments ou polluants. Celle-ci se déroule en 2 étapes à l'issue desquelles le composé devenu toxique sera converti en un composé polaire hydrophile dont la solubilité permettra son élimination par les fluides biologiques, principalement les urines ou la bile.

2.1.1. Phase I : les cytochromes

Les enzymes de phase I appartiennent essentiellement (75%) à la famille des cytochromes P450 (Nebert and Russell, 2002). Elles catalysent les réactions d'oxydo-réduction ou d'hydrolyse nécessaires à la formation d'un groupement polaire (David Josephy et al., 2005). Celui-ci permettra aux enzymes de phase II d'intervenir à leur tour ; cette étape est dite de fonctionnalisation. Chez l'Homme, CYP3A4 (Cyp3a11 chez la souris) est retrouvée majoritairement au niveau du foie et de l'intestin (Bodin et al., 2005). Elle permet la synthèse des acides biliaires hydroxylés H-CA et H-DCA à partir du CDCA et du LCA respectivement ; plus hydrophiles ces derniers seront moins toxiques. CYP3A4 prend également en charge l'élimination de la testostérone (Waxman, 1988) ou encore celle de l'oestradiol (Kerlan et al., 1992). Plusieurs études mettent en évidence la régulation de *Cyp3a11* par les acides biliaires (Gnerre et al., 2004). Cette signalisation met en jeu $\text{Fxr}\alpha$. De plus, le traitement d'une lignée d'hépatocytes murins HepG2 par du CDCA ou par le GW4064, conduit à l'induction des niveaux de transcrits *Cyp3a11*. Ce même mécanisme existe *in vivo* ; chez la souris, l'injection de GW4064 augmente l'accumulation des transcrits *Cyp3a11* au niveau hépatique.

2.1.2. Phase II : la conjugaison

Les enzymes de la phase II sont dites de conjugaison (David Josephy et al., 2005). Elles catalysent les réactions de transfert d'un acide glucuronique ou d'un groupement sulfate menant à la production de dérivés stéroïdiens glucuro ou sulfo conjugués. Dans le foie, ces derniers seront pris en charge par les transporteurs Mrp3 et Mrp4 au niveau de la membrane sinusoïdale des hépatocytes (Keppler, 2011). Ils rejoindront ainsi la circulation sanguine et seront éliminés par la voie urinaire.

En situation physiologique le LCA est majoritairement présent sous sa forme sulfatée (95%) et ce dans le but de réduire ses propriétés détergentes et de favoriser son élimination (Alnouti, 2009). Il est intéressant de noter que lors de troubles cholestatiques les niveaux de LCA-S hépatiques et plasmatiques diminuent au profit de fortes concentrations retrouvées aux niveaux des urines (Summerfield et al., 1977). Ce profil est un peu différent en ce qui concerne les dérivées gluco-conjugués. En effet, les patients souffrant de cholestases présentent une augmentation de près de 50 fois des concentrations plasmatiques d'acides biliaires gluco-conjugués ; dans les urines celles ci peuvent atteindre près de 100 fois les niveaux physiologiques (Takikawa et al., 1983)

Les enzymes permettant la sulfonation sont les enzymes Sult (*Sulfotransférase*) tandis que la glucuronidation est catalysée par les enzymes UGT (*Uridine diphosphate glycosyltransférases*). Ugt2b4 est une glucotransferase exprimée abondamment dans le foie et l'intestin. Outre la prise en charge de la détoxification des acides biliaires, elle exerce son activité sur une large gamme de composés tels que les xénobiotiques, les oestrogènes ou encore la testostérone (Turgeon et al., 2001). Dans des cultures primaires d'hépatocytes humains, l'activation de FXR α sur le promoteur du gène codant *UGTB4* par le CDCA ou le GW4064 conduisent à une augmentation de sa transcription (Barbier et al., 2003).

De part la régulation des enzymes de la phase 1 et 2 du catabolisme hépatique, les acides biliaires sont capables de réguler positivement leur propre élimination. En conditions cholestatiques, l'induction des systèmes de détoxications pourrait interférer avec le maintien de l'homéostasie d'autres composés endogènes tels que les hormones stéroïdiennes et être à l'origine de pathologies annexes telles que l'hypo-androgénie ou le développement de cancers hormono-dépendants (Koruk et al., 2004). Cette notion est plus amplement discutée dans la revue présentée en annexe de ce manuscrit (Baptissart et al., 2013a)

3. La cholestase : pathologie associée aux acides biliaires

La cholestase est définie par une réduction du flux biliaire depuis les hépatocytes jusqu'au tractus digestif. Les conséquences sont une accumulation dans le foie, le sang et les tissus extra-hépatiques des substances normalement excrétées dans la bile (acides biliaires, bilirubine, cholestérol), et une malabsorption des graisses de la lumière intestinale. On distingue classiquement trois types de cholestases établis en fonction de leur étiologie : 1 - intimement liée à la pathologie hépatique, la cholestase dite « cellulaire » est associée à un dysfonctionnement hépatocytaire ; 2 - les cholestases obstructives intra-hépatiques sont la conséquence d'une perte d'intégrité du réseau de canalicules biliaires ; cette situation est par exemple retrouvée dans le cadre de pathologies telles que la cirrhose biliaire primitive, ou CBP ; 3 - les cholestases obstructives extra-hépatiques sont secondaires à un

obstacle sur les voies biliaires principales. Il est à noter que dans le contexte de cholestases obstructives, l'accumulation de bile dans le foie se trouve elle-même à l'origine d'une hépatotoxicité qui contribue alors à entretenir la maladie.

3.1. Les différentes cholestases

3.1.1. *Cholestases hépatocytaires : du trouble hépatique à la cholestase*

Les pathologies du foie désignent de manière générale tout trouble hépatique conduisant au dysfonctionnement des hépatocytes. Il existe plus d'une centaine de maladies du foie ; parmi elles l'hépatite, la cirrhose alcoolique ou encore la stéatose hépatique. Ces dernières peuvent de manière chronique évoluer à l'état de cirrhose et conduire au carcinome hépatique. Bien que le trouble hépatique ne soit pas nécessairement initié par la présence toxique d'acides biliaires (comme c'est le cas lors de cholestases obstructives), leur accumulation dans le foie puis dans le sang lors de celles-ci conduit au syndrome cholestatique et aggrave la situation des patients (Gossard and Talwalkar, 2014).

a) Pathologies hépatiques : épidémiologie

L'incidence des troubles hépatiques n'a cessé d'augmenter ces dernières années. En Europe, il est estimé à près de 29 millions le nombre de patients souffrant de maladies chroniques du foie (Blachier et al., 2013)(Tsochatzis et al., 2014). La surconsommation d'alcool, l'usage inadapté de médicaments, les infections virales et l'augmentation du syndrome métabolique sont les principales causes de cette tendance. En France on dénombre aujourd'hui près de 700 000 cas de cirrhose, dont 30 % au stade sévère. L'âge moyen du diagnostic est estimé à 50 ans. Pendant plusieurs mois voire plusieurs années, la pathologie hépatique peut ne déclencher aucun symptôme. On parle alors de cirrhose "non compliquée" ou "compensée". Elle est alors découverte par hasard dans le cadre d'examen de santé de routine. Dans près de 80 à 90% des cas la maladie n'est jamais déclarée et reste à l'état silencieux.

b) Pathologies hépatiques : étiologies

Les pathologies du foie présentent des étiologies diverses. Elles peuvent être héréditaires comme la maladie de Wilson et l'hémochromatose (Lawless et al., 2008), ou provoquées par la consommation chronique d'alcool ou l'exposition prolongée à des toxines environnementales (toxines industrielles comme le chlorure de polyvinyle ou le tétrachlorure de carbone) (Milstein et al., 1976). L'usage inapproprié de médicaments tels les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ou encore les contraceptifs oraux est connue pour entraîner une hépatotoxicité (Smith, 1974) ; on parle alors

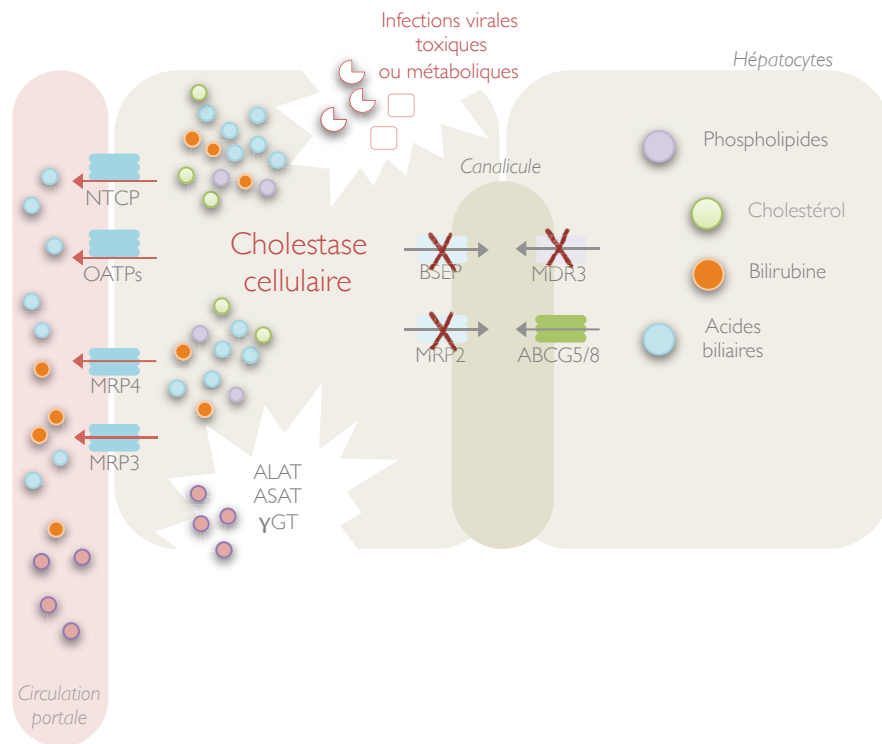


Figure 28. Physiopathologie de la cholestase hépatocytaire chez l'Homme.

Les pathologies hépatiques ont pour origine des infections virales (hépatites A, B ou C), toxiques (médicamenteuse ou alcoolique) ou métaboliques (NASH). Plus ou moins sévères, ces dernières provoquent la perte de fonction des hépatocytes. L'excrétion des acides biliaires est redirigée vers la membrane sinusoidale ; les acides biliaires rejoignent alors la circulation sanguine. La lyse des hépatocytes provoque la libération des transaminases ALAT et ASAT, ainsi que celle des γ GT dans la circulation portale.

ALAT, Alanine amino transferase ; ASAT, Aspartate amino transferase, ; γ GT, gamma-glutamyl transpeptidase ; BSEP, Bile salt export pump ; NTCP, Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide ; MRP, Multidrug-resistance protein ; MDR3, Multidrug resistance P-glycoprotein type 3 ; OATP, Organic anion transporter

d'hépatite d'origine médicamenteuse. Le trouble hépatique peut également être la conséquence d'infections bactériennes ou virales comme c'est le cas lors des hépatites de type A, B et C (Shima et al., 2000, Geier, 2014). D'autres maladies hépatiques sont associées à des désordres métaboliques ; c'est par exemple le cas de stéatoses hépatiques non alcooliques (NASH), pathologies courantes dans le cadre de patient atteint de syndrome métabolique (Dietrich and Hellerbrand, 2014).

c) Du trouble hépatique à la cholestase

Les pathologies hépatiques aiguës et chroniques sont toutes caractérisées par une inflammation associée à la production de cytokines (TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-8) (Trauner et al., 1999). Plus ou moins sévère, celle-ci peut à terme provoquer la perte de fonction des hépatocytes. L'excrétion des acides biliaires est alors redirigée vers la membrane sinusoïdale des hépatocytes pour rejoindre la circulation sanguine (Zollner et al., 2003). Le trouble hépatique donne ainsi lieu à la pathologie qui lui est associée, la cholestase hépatocytaire (Figure 28) (Trauner and Boyer, 2002).

La perte des fonctions de sécrétion des hépatocytes peut également être provoquée par la mutation de transporteurs membranaires (Davit-Spraul et al., 2009). La cholestase est alors génétique, ou héréditaire. La cholestase intrahépatique familiale progressive de type 2, ou PFIC 2 (*Progressive familial intrahepatic cholestasis*), est causée par une mutation autosomique récessive du gène ABCB11 codant pour le transporteur majoritaire des acides biliaires : le transporteur BSEP. Elle provoque un arrêt ou une réduction de l'excrétion des acides biliaires dans les canalicules biliaires qui évolue vers l'insuffisance hépato-cellulaire souvent avant l'adolescence. Les patients présentent des niveaux sériques de transaminases élevés ainsi qu'une augmentation des concentrations sériques d'acides biliaires de 30 fois supérieure à la normale (Davit-Spraul et al., 2010).

3.1.2. Cholestases obstructives

a) Cholestases obstructive intra hépatiques

La cholestase peut être provoquée par l'inflammation et la perte d'intégrité du réseau de canalicules biliaires intra hépatiques lors des stades avancés de pathologies hépatiques chroniques (Figure 29). Les hépatopathies associées à un nombre réduit de conduits biliaires sont nombreuses. Les exemples les mieux connus sont ceux des maladies chroniques auto-immunes de type cirrhose biliaire primitive (CBP) et cholangite sclérosante primitive (CSP) (Poupon, 2010, Silveira and Lindor, 2008). Touchant dans un premier temps les canalicules biliaires interlobulaires, l'inflammation peut s'étendre aux tissus hépatiques voisins. Les 15-20 premières années, la pathologie demeure le plus souvent asymptomatique. Les concentrations d'acides biliaires sont toutefois déjà élevées. Le syndrome cholestatique (démangeaisons, troubles intestinaux) sera alors à l'origine de la suspicion de la maladie

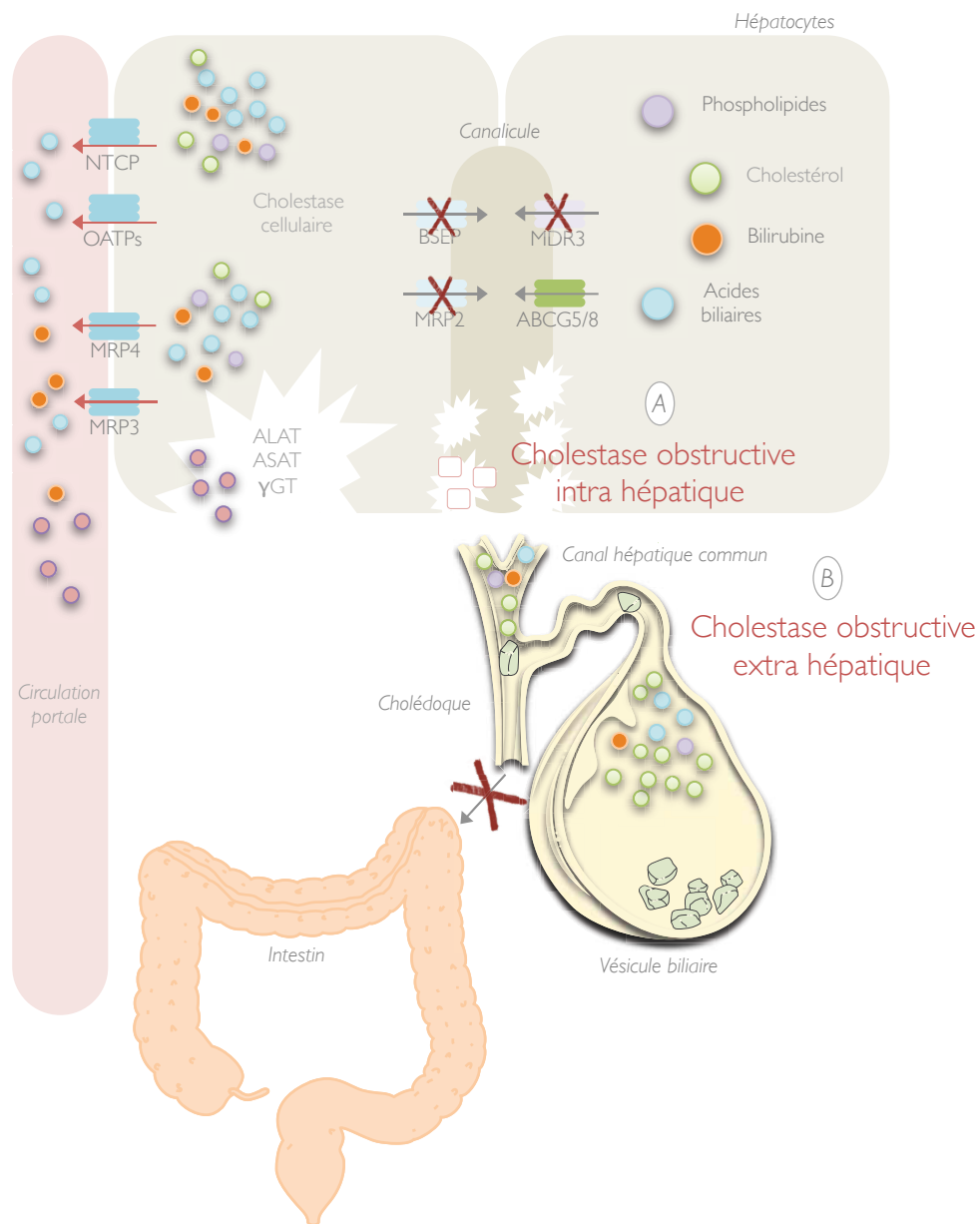


Figure 29. Physiopathologie des cholestases obstructives chez l'Homme.

A, Les cholestases obstructives intra-hépatiques sont provoquées par l'inflammation et la perte d'intégrité du réseau de canalicules biliaires intra hépatiques. Leurs étiologies sont diverses. Elles peuvent résulter d'infections hépatiques chroniques ou de pathologies auto-immunes associées à une diminution du nombre de canalicules (CBP ou CSP). **B**, Les cholestases obstructives extra-hépatiques sont provoquées par l'occlusion des voies biliaires principales (canal hépatique commun, cholédoque). La saturation de la bile en cholestérol conduit à la formation de cristaux lithiasiques ou calculs biliaires venant s'opposer à l'écoulement de la bile. D'autres contraintes extrinsèques peuvent conduire à l'obstruction des voies biliaires principales. La compression par le fœtus des canaux biliaires en fin de grossesse est l'une des étiologies de la cholestase gravidique.

ALAT, Alanine amino transférase ; ASAT, Aspartate aminotransférase ; γGT, gamma-glutamyl transpeptidase ; BSEP, Bile salt export pump ; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide ; MRP, Multidrug-resistance protein ; MDR3, Multidrug resistance P-glycoprotein type 3 ; OATP, Organic anion transporter

et son diagnostic sera appuyé par les marqueurs classiques de souffrance hépatiques (bilirubine ; γ -GT, *gamma-glutamyl-transpeptidases* ; ALAT, *alanine aminotransferase* ; ASAT, *aspartate aminotransferase*). A des stades plus avancés l'inflammation chronique peut se traduire par une perte de fonction hépatique et le développement de cirrhose pouvant évoluer jusqu'au carcinome. Tandis que la CBP est retrouvée le plus fréquemment chez la femme âgée de plus de 40 ans (10 femmes atteintes pour 1 homme), la CSP touche principalement les hommes (dans 50-80% des cas) et ce dès l'enfance ; l'âge médian de la CSP est estimé à 40 ans.

b) Cholestases obstructive extra-hépatiques

La cholestase peut également être provoquée par une obstruction des voies biliaires principales (cholédoque, canal hépatique commun) (Figure 29) : on parle alors de cholestase d'origine extra hépatique. La lithiase, plus communément appelée « calculs biliaires », en est la cause la plus fréquente. Il est estimé à 20% le nombre d'adultes de plus de 40 ans développant la maladie, et près de 10% de la population américaine est aujourd'hui concernée (Schirmer et al., 2005, Stinton and Shaffer, 2012). Des concentrations trop élevées en cholestérol (hypercholestérolémie, syndrome métabolique) (Petitti et al., 1981, Méndez-Sánchez et al., 2005, Bonfrate et al., 2014) ou le défaut de sécrétion de phospholipides dans la bile (mutations pour le transporteur MDR3) (Benzimra et al., 2013) déplacent l'équilibre du ratio cholestérol/phospholipides ($\text{cholestérol/phospholipides} < 1$). Les concentrations en cholestérol deviennent saturantes et ce dernier précipite alors sous la forme de cristaux. La pathologie lithiasique peut également être associée à un défaut de synthèse et ou réabsorption des acides biliaires comme par exemple lors d'infections intestinales telle que la maladie de Crohn (Fraquelli et al., 2001). De la même manière que pour le défaut de phospholipides, la diminution de la composition de la bile en acides biliaires conduit à une sursaturation du cholestérol (Hutchinson et al., 1994). Près de 80 % des patients ayant un calcul vésiculaire n'ont jamais de symptôme (Sakorafas et al., 2007). Dans 20% des cas celle-ci va cependant être associée à une insuffisance hépatique due à l'accumulation toxique d'acides biliaires (Friedman, 1993).

L'obstruction des voies biliaires peut également être provoquée par des compressions extrinsèques des canaux biliaires (Moss et al., 2006). Des pathologies tumorales telles que les cholangiocarcinomes ou l'adénocarcinome du pancréas sont des tumeurs malignes pouvant être à l'origine de cholestases.

3.1.3. Cholestase gravidique

La cholestase gravidique (ICP, *Intrahepatic cholestasis of pregnancy*), est une pathologie courante de la femme enceinte (0,4 – 1,5% des grossesses). Elle survient au troisième trimestre de la

grossesse puis les symptômes disparaissent après l'accouchement (Geenes and Williamson, 2009). Les causes exactes de cette pathologie sont encore méconnues. D'abord associée à une compression extrinsèque des canaux biliaires par le fœtus en fin de grossesse, des études récentes montrent que les hauts niveaux d'oestrogènes, de progestérone ainsi que de leurs métabolites durant cette période pourraient également être liés à la pathologie (Abu-Hayyeh and Williamson, 2014, Song et al., 2014). Le traitement de cultures primaires d'hépatocytes humains par du 17β -oestradiol conduit à la répression transcriptionnelle de BSEP. Celle-ci est médiée par l'intervention du récepteur $ER\alpha$ qui, fixé à $FXR\alpha$ en réponse aux oestrogènes, réprime son activité transactivatrice sur le promoteur de BSEP (Song et al., 2014).

La cholestase gravidique s'accompagne d'une augmentation des niveaux plasmatiques de transaminases signant la souffrance hépatique qui lui est associée ; les concentrations d'acides biliaires peuvent atteindre jusqu'à 14 fois celles mesurées en physiologie basale (Joshi et al., 2010). Outre la gêne occasionnée par les démangeaisons (prurit), la cholestase gravidique a peu de conséquences chez la mère. En revanche, cette pathologie peut avoir des répercussions graves pour le fœtus (Glantz et al., 2004). Une récente étude clinique montre que les concentrations d'acides biliaires chez la mère sont corrélées à l'atteinte du fœtus : poids du corps réduit, naissance prématurée, voire décès de l'enfant dès les premiers jours de vie (Kowalski et al., 2014). Récemment, c'est à partir de données métaboliques recueillies sur une cohorte d'enfants de 16 ans nés de grossesses cholestatiques, que l'équipe de Williamson a pu mettre en évidence une corrélation entre cholestase gravidique et prédisposition au syndrome métabolique (altération du profil lipidique) (Papacleovoulou et al., 2013). Complétée par un modèle murin, cette étude suggère que, lors de la grossesse, l'accumulation de cholestérol et de lipides dans le sang du cordon ombilical pourrait être à l'origine d'un défaut de programmation du métabolisme fœtal se répercutant à l'âge adulte par le développement de pathologies telles que l'obésité ou le diabète.

3.1.4. Cholestase néonatale

Le nouveau-né durant les deux premières semaines de vie est particulièrement exposé au développement de cholestase en raison de l'immaturité des mécanismes de la sécrétion biliaire (De Bruyne et al., 2011). Les cholestases du nouveau-né sont particulières par leur incidence relativement élevée (1/2500 naissances) (Feldman and Sokol, 2013). La pathologie est généralement suspectée par la présence de selles décolorées. Son diagnostic est confirmé par l'augmentation de marqueurs de souffrances hépatiques ainsi que par l'élévation des concentrations d'acides biliaires chez le nourrisson (Pawłowska et al., 1990).

Les causes de cholestase néonatales sont multiples (revue exhaustive (Feldman and Sokol, 2013). A l'image des cholestases chez l'adulte, elles peuvent être la conséquence d'insuffisances hépatocellulaires (génétiques, métaboliques ou infectieuses) ou de troubles obstructifs intra/extra-hépatiques. Dans près de la moitié des cas, la cholestase néonatale est associée à une atésie des voies biliaires (Bernard, 1995). Cette pathologie inflammatoire conduit à la destruction de 80% des conduits biliaires communs intra et extra hépatiques. Bien que l'origine de cette pathologie demeure à ce jour encore floue, celle-ci pourrait impliquer des mécanismes auto-immuns dirigés contre les voies biliaires (Carvalho et al., 2005). Le seul traitement pertinent dans ce contexte est une intervention chirurgicale consistant à contourner les voies biliaires affectées en reliant les voies saines directement à l'intestin (portoentérostomie Kasaïen). Ces enfants seront tout de même exposés à une forte prédisposition au développement de cirrhoses dues aux atteintes du réseau canaliculaire intra hépatique et une transplantation du foie est souvent nécessaire durant la seconde enfance ou l'adolescence (Fouquet et al., 2005).

Dans 5 à 10% des cas la cholestase néonatale est transitoire ou « bénigne » (Jacquemin et al., 1998). L'origine de son développement est multifactorielle ; l'immaturité des sécrétions biliaires associée à une souffrance hépatique fœtale (ex : ischémie chronique) ou néonatale (infectieuse le plus souvent) pourrait favoriser le développement de la pathologie (Suchy et al., 1987). De plus, le fait que cette dernière touche le plus souvent le petit garçon (ratio 2 : 1) suggère une étiologie liée aux stéroïdes sexuels. Les concentrations d'acides biliaires sériques peuvent atteindre jusqu'à 10 fois les concentrations physiologiques (pathologie : 61 à 372 $\mu\text{mol/L}$; physiologie <15 $\mu\text{mol/L}$) ; elles sont diminuées progressivement et ne seront restaurées en moyenne qu'à partir de l'âge de 10 mois alors que les signes cliniques de la cholestase (jaunisse) auront quant à eux disparus (Jacquemin et al., 1998). Son évolution est spontanément favorable et le seul traitement indiqué sera symptomatique : l'administration intramusculaire de vitamines liposolubles A, D, E et K et un régime enrichi en triglycérides compenseront les carences digestives dues à l'absence d'acides biliaires dans le tractus intestinal.

3.2. Signes cliniques de la cholestase

La cholestase provoque une grande diminution de la qualité de vie (Figure 30). Des démangeaisons intenses ou prurit touchent précocement et au moins transitoirement la majorité des patients atteints de cholestase. L'origine de ce symptôme a été récemment attribuée à l'action des acides biliaires *via* l'activation de TGR5 dans les cellules nerveuses cutanées (Lieu et al., 2014). La bilirubine est un pigment jaune, produit de dégradation de l'hémoglobine. Conjugué par les enzymes de détoxification hépatiques, ce composé est en condition physiologique évacué par la bile. Lors de

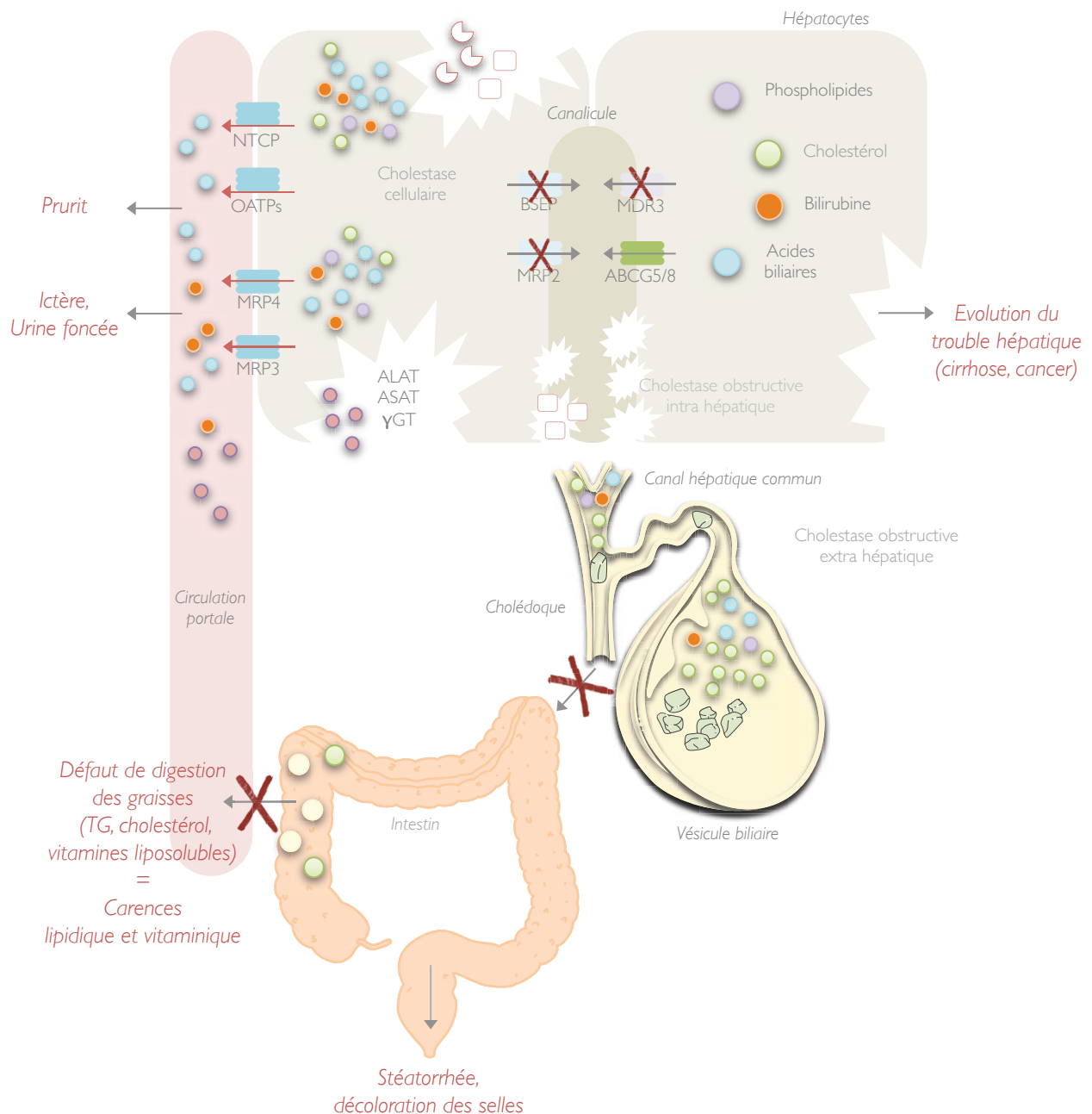


Figure 30. Les signes cliniques de la cholestase.

L'élévation des concentrations d'acides biliaires plasmatiques est le premier marqueur de la cholestase. Accumulés dans les cellules nerveuses de la peau, ils provoquent des démangeaisons intenses, ou prurit. La bilirubine retrouvée dans le sang conduit à l'ictère (jaunissement de l'œil, des téguments, urines foncées). L'absence d'acides biliaires au niveau intestinal provoque une malabsorption des composés alimentaires lipophiles (amaigrissement, stéatorrhée, nausées et indigestions). Les carences en vitamines D et K s'accompagnent d'ostéoporose. En chronique et à moyen terme, la cholestase peut conduire au développement de cirrhose et favoriser le développement tumoral.

ALAT, Alanine amino transférase ; ASAT, Aspartate aminotransférase ; γGT, gamma-glutamyl transpeptidase ; BSEP, Bile salt export pump ; NTCP, Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide MRP, Multidrug-resistance protein ; MDR3, Multidrug resistance P-glycoprotein type 3 ; OATP, Organic anion transporter

cholestase, son accumulation au niveau sanguin provoque une jaunisse, ou ictère ; le fond de l'œil n'est plus blanc, les téguments jaunissent et les urines deviennent plus foncées (Fevery, 2008, Levitt and Levitt, 2014). Les patients présentent généralement une fatigue intense dont l'origine serait entre autre attribuée à une altération des aires cérébrale du sommeil et un dysfonctionnement du métabolisme énergétique au sein des muscles squelettiques et cardiaques (Griffiths and Jones, 2014). D'autre part, les patients atteints de cholestase présentent un déficit en acides biliaires au niveau du tractus intestinal et souffrent de malabsorption des graisses (amaigrissement, stéatorrhée, nausées et indigestions). On observera par exemple une baisse anormale du cholestérol sérique (LDL). Les carences en vitamine D et K sont entre autres responsables de troubles du métabolisme osseux (ostéoporose) (Fisher et al., 2009). Lors de cholestases chroniques ou de crises aiguës les conséquences peuvent être plus avancées. La toxicité due à l'accumulation d'acides biliaires au niveau hépatique peut conduire à la cirrhose et favoriser le développement tumoral (carcinome hépatique) (Baptissart et al., 2013b).

3.3. Les acides biliaires : premier marqueur de la pathologie

Longtemps asymptomatiques, les cholestases chroniques sont dans la majeure partie des cas diagnostiquées tardivement lors d'examens de santé de routine. Plusieurs marqueurs biochimiques sont utilisés en clinique pour identifier l'origine de la pathologie et caractériser son état d'avancement. Ces derniers sont pour la plupart similaires à ceux utilisés plus généralement dans le cadre de souffrances hépatiques. Les transaminases cytosoliques (ALAT, ASAT) et l'enzyme mitochondriale γ -GT sont présents au sein des hépatocytes (Bulle et al., 1990); lors des dommages cellulaires induits par la cholestase, le contenu des cellules hépatiques se déverse dans le sang et leurs concentrations peuvent atteindre de 5 à 20 fois les concentrations physiologiques. La bilirubine ou encore la phosphatase alcaline (PAL) sont des acteurs de la physiologie hépatique dont l'élimination est prise en charge par les voies biliaires. Lors de pathologies hépatiques, leur excrétion est redirigée vers la membrane sinusoidale des hépatocytes pour rejoindre la circulation sanguine (Watanapa, 1996). Au delà de 40mmol/L soit plus de 2 fois les concentrations physiologiques, la bilirubine est responsable d'un ictère (Fevery, 2008).

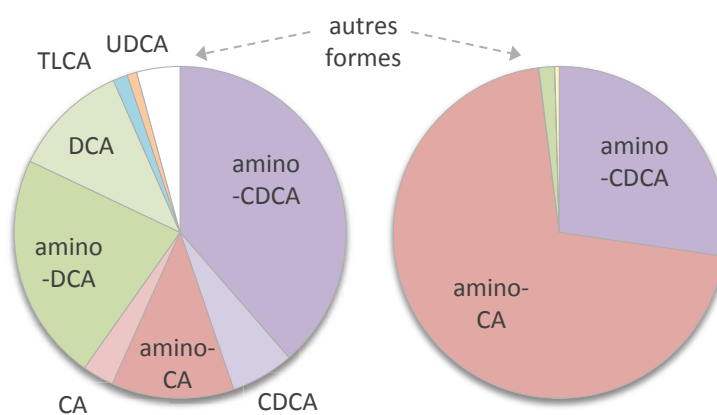
D'autres tests peuvent venir confirmer le diagnostique de la cholestase. Ceux-ci peuvent comprendre des méthodes invasives telles qu'une biopsie du foie. Le recours à l'imagerie est utile pour préciser l'origine de cholestase obstructives. On fait alors appelle à la cholangiographie, ou à l'IRM (imagerie par résonance magnétique) (Bricault, 2013).

Uniquement utilisé à titre diagnostique lors de cholestases gravidiques (Brites et al., 1998) ou lors du rejet de greffes du foie (Baumgartner et al., 1995), l'accumulation des acides biliaires est

Concentrations sériques (nM)

	individus sains	patients cholestatiques
total-CDCA	945 ± 1340	30 500 ± 19 190
t-CDCA	95 ± 150	18 130 ± 10 430
g-CDCA	720 ± 810	12 370 ± 8 760
CDCA	130 ± 380	ND
total-CA	317 ± 400	78 990 ± 63 800
t-CA	62 ± 70	53 920 ± 42 620
g-CA	190 ± 230	25 030 ± 21 110
CA	65 ± 100	40 ± 70
total-DCA	710 ± 1070	1 725 ± 3 615
t-DCA	80 ± 140	1 030 ± 2 140
g-DCA	390 ± 650	680 ± 1 450
DCA	240 ± 280	15 ± 25
total-LCA	30 ± 25	ND
UDCA	20 ± 30	ND
autres formes	89 ± 161	480 ± 780
Total	2 135 ± 2 120	111 700 ± 80 940

% de la concentration sérique totale		
Primaires	58 ± 14	97 ± 3
Secondaires	40 ± 13	2 ± 3
CA/CDCA	0,5 ± 0,4	2,5 ± 1,1
Tauro/glyco	0,3 ± 0,3	3 ± 3,5



Modifié à partir de Humbert et al., 2012

Figure 31. Comparaison des quantités et compositions d'acides biliariques sériques d'Homme sains et cholestatiques.

CA, acide cholique ; CDCA, acide chénodésoxycholique ; DCA, acide désoxycholique ; LCA, acides lithocholique ; t, tauro-conjugués ; g, glyco-conjugués. Composé à partir de Humbert et al., 2012

pourtant le premier signe biochimique d'une souffrance hépatique. Une récente étude menée chez le rat s'est penchée sur l'analyse des concentrations plasmatiques de 1900 métabolites à la suite de l'induction d'hépatopathies de diverses natures (Yamazaki et al., 2013). Le marqueur le plus précoce et le plus sensible s'est révélé être l'augmentation des concentrations d'acides biliaires plasmatiques. Selon le trouble hépatique induit, celles-ci peuvent atteindre de 2 à 330 fois les niveaux physiologiques.

Chez l'Homme, de rares études sont disponibles quant aux concentrations normales et pathologiques des acides biliaires dans les fluides biologiques. Les limites techniques d'analyse ainsi que la grande variabilité inter-individuelle observée aussi bien en condition physiologique que pathologique rendent difficile la cohérence des données (Humbert et al., 2012). Les concentrations plasmatiques d'acides biliaires sont estimées en moyenne de 2 à 10 $\mu\text{mol/L}$ chez un adulte sain. Le profil sérique est à l'image de celui de la bile, c'est-à-dire majoritairement formé de CDCA, DCA et CA que l'on retrouve en grande majorité (60-90%) sous leurs formes amino-conjuguées (Humbert et al., 2012; Tagliacozzi et al., 2003; Xiang et al., 2010). Le détail de la composition sérique physiologique en acides biliaires est présenté dans la Figure 31.

Lors de troubles cholestatiques, les concentrations peuvent être multipliées par 10 dans le cadre d'hépatites chroniques ou de cirrhoses alcooliques, et peuvent atteindre 50 fois les niveaux physiologiques dans le cadre d'obstructions biliaires ou d'hépatites virales chroniques (Valentini et al., 2013). L'élévation quantitative des acides biliaires se fait majoritairement en faveur de 4 acides biliaires primaires conjugues: t-CA, g-CA et t-CDCA, g-CDCA (Tagliacozzi et al., 2003; Trottier et al., 2011). Le ratio acides biliaires primaires totaux (CA-CDCA)/secondaires totaux (CDCA-DCA) est alors augmenté (Brites et al., 1998)(Ye et al., 2007). Le CA devient l'acide biliaire prédominant et le rapport CA/CDCA est multiplié par 5 (Humbert et al., 2012). D'autre part la proportion d'acides biliaires tauro-conjugues devient supérieure à celle des glyco conjugués inversant le ratio observé classiquement en physiologie (tauro/glyco ; 1:3).

3.4. Prise en charge et traitements

Le traitement de la cholestase vise à limiter et à ralentir les complications dues à la toxicité des acides biliaires. L'acide ursodeoxycholique (AUDC) est le traitement de première intention dans le cadre des maladies cholestatiques (European Association for the Study of the Liver, 2009). Présent en faible proportion chez l'homme, il s'agit en revanche d'un acide biliaire majeur chez l'ours dont la bile était utilisée pour le traitement des désordres hépato biliaires (Hagey et al., 1993). Son administration vise à réduire l'impact détergent de l'accumulation des acides biliaires en favorisant la sécrétion des phospholipides et en conférant un caractère plus hydrophile à la bile (Zollner et al., 2003). Plusieurs

ligands agonistes de FXR α sont à ce jour en phase de test clinique pour le traitement de pathologies associées à une augmentation des concentrations d'acides biliaires telles que les CBP (Wagner et al., 2011). Le 6-éthyl-CDCA (INT-747) est par exemple reconnu chez la souris pour ses propriétés anti-fibrotiques lors de cholestases en favorisant notamment l'expression par Fxr α du transporteur *Bsep* et donc l'excrétion des acides biliaires par les hépatocytes. De plus, la présence 6-éthyl-CDCA permet de réguler négativement la néo-synthèse des acides biliaires *via* la répression de *Cyp7a1*.

Les carences en vitamines K, D et E, sont compensées par l'administration d'injectables (European Association for the Study of the Liver, 2009). Des antibiotiques tels que la rifampicine sont utilisés comme traitement contre le prurit (Gregorio et al., 1993). La rifampicine régule également plusieurs gènes impliqués dans la détoxification des acides biliaires par l'intermédiaire de l'activation du récepteur PXR. Certaines pathologies cholestatiques, dont la PBC et la PSC, ont une forte composante immunitaire ; leur traitement par des agents immunosuppresseurs dérivés des corticoïdes permet une amélioration des caractéristiques histologiques hépatiques. Jusqu'à maintenant, l'unique traitement curatif pour la cholestase chronique est la transplantation hépatique.

Partie 3. Présentation du projet de recherche

Chez l'homme, des données cliniques décrivent une association entre des pathologies hépatiques (cirrhose toxique, hépatites virales) et l'infertilité (Pusch, 1984, Mooradian et al., 1985, Durazzo et al., 2006). Une étude a récemment été menée sur une cohorte de 50 patients souffrant d'hépatite C chronique (1 an minimum de temps écoulé après diagnostic). Le tiers d'entre eux présente une hypofertilité tandis que les deux tiers sont stériles. Tous présentent des anomalies de spermogramme plus ou moins sévères. Le nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat est en moyenne diminué de moitié. Cette anomalie quantitative est associée à des anomalies morphologiques des spermatozoïdes. Le profil endocrinien de ces patients est affecté et on note une hypo-androgénie plasmatique indépendante d'une diminution de la LH (Hofny et al., 2011).

L'association physiopathologique entre désordres hépatiques et troubles de la fertilité a été validée et précisée par l'étude de plusieurs modèles expérimentaux. Chez le rat ou le poulet, la ligature des voies biliaires conduit à l'accumulation toxique de bile dans le foie (Van Thiel et al., 1985 ; Kiani et al., 2009). Celle-ci se traduit rapidement par une perte de fonction des hépatocytes et par le développement d'une stéatose caractéristique du trouble cholestatique (Houten et al., 2007). Dans ce contexte pathologique extrême, ces études ont permis de mettre en évidence une diminution du taux de testostérone plasmatique indépendante de l'axe hypothalamo-hypophysaire, associée à une perte de la lignée germinale. Par ailleurs, l'utilisation d'un modèle murin de cirrhose toxique induite par un agent chimique (CCl₄) conduit à un phénotype testiculaire lié notamment à une déstructuration de la BHT (Castilla-Cortazar et al., 2004).

L'ensemble de ces travaux soutient l'hypothèse selon laquelle l'infertilité observée dans le cadre d'hépatopathies chez l'homme serait en partie liée à un défaut des fonctions endocrines et exocrines du testicule. Pour autant, aucune étude n'a permis d'identifier formellement le lien moléculaire pouvant expliquer cette association physiopathologique.

L'ensemble des pathologies hépatiques a pour dénominateur commun une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires et ce dès les stades les plus précoces de la maladie. Dans ce contexte pathologique, l'hypothèse de l'impact délétère des acides biliaires sur la fonction reproductrice mâle et plus particulièrement sur la physiologie testiculaire reste à explorer.

Cette hypothèse est appuyée par les données bibliographiques mettant clairement en évidence l'implication des acides biliaires et de leurs signalisations (Fxr α ; Tgr5) dans la régulation de multiples processus physiologiques et physiopathologiques (dérégulations métaboliques, cancer...). D'autre

part, les transcrits des récepteurs aux acides biliaires *Fxrα* et *Tgr5* ont de manière intéressante été mis en évidence au niveau testiculaire (Vassileva et al., 2006, Volle et al., 2007).

Les fonctions potentielles de *Tgr5* dans le testicule n'ont à ce jour jamais été explorées. Aussi, l'hypothèse de sa participation au phénotype testiculaire dans le cadre de cholestases n'est pas exclue et reste à définir.

En 2007, les travaux de Volle *et al.* ont permis pour la première fois de préciser la localisation de *Fxrα* ; majoritairement présent au niveau de l'espace interstitiel, il est capable d'agir en tant que répresseur de la synthèse des androgènes testiculaires (Volle et al., 2007). Chez la souris, un traitement par le GW4064, ligand synthétique de *Fxrα*, se traduit à court terme par une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone et ce indépendamment d'un défaut de sécrétion de Lh par l'axe central. Cette étude est complétée par la description des mécanismes moléculaires mis en jeu. Dans les cellules de Leydig, *Fxrα* est capable, *via* l'induction de *Shp*, de réprimer l'activité des récepteurs Sf-1 et Lrh-1 sur le promoteur des enzymes principales de la stéroïdogénèse (*Star*, *Cyp11a1* et la *3βhsd*). Les travaux de Catalano menés *in vitro*, ont depuis fait référence à l'implication de *Fxrα* dans la répression de la synthèse des oestrogènes. Dans une lignée de cellules tumorales de Leydig, *Fxrα* entre en compétition avec Sf-1 pour la fixation sur un site commun du promoteur du gène codant pour l'Aromatase et réduit ainsi son expression. Basées sur une démonstration très mécanistique du rôle testiculaire de *Fxrα* (ligand synthétique, observation *in vivo* à court terme, modèles de lignées cellulaires cancéreuses), ces études soulèvent plusieurs interrogations quant aux conséquences phénotypiques pouvant être liée à son hyperactivation sur le long terme.

Au final, l'ensemble de ces données suggère que les acides biliaires et leurs signalisations (*Tgr5/Fxrα*) puissent participer au phénotype testiculaire observé dans le cadre des modèles expérimentaux d'insuffisance hépatique, et être l'un des liens entre les hépatopathies et l'infertilité chez l'homme.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet de thèse ont été : **1) d'identifier et de caractériser l'impact de concentrations supra-physiologiques d'acides biliaires sur la physiologie testiculaire et le maintien des fonctions de reproduction à l'âge adulte ; 2) d'en évaluer les conséquences sur la qualité de la descendance, et enfin ; 3) de déterminer l'impact de l'accumulation pathologique d'acides biliaires lors la mise en place des fonctions de reproduction.**

L'ensemble de ces études est basée sur l'analyse phénotypique, histologique, biochimique, et moléculaire d'un modèle de souris mâles adultes de souche C57Bl/6J nourries par un régime supplémenté en CA (0,5% CA), acide biliaire retrouvé majoritairement accumulé lors des phases précoces de la pathologie cholestatique (Humbert et al., 2012 ; Yamazaki et al., 2013).

Deux fenêtres d'exposition seront choisies. A l'âge adulte, elle permettra de mettre en évidence les conséquences de concentrations supra-physiologiques d'acides biliaires sur le maintien de la fertilité ainsi que sur l'intégrité de la descendance des mâles exposés. Chez des souris de 21 jours, nous répondrons à l'influence du contexte physiopathologique de la cholestase sur la mise en place des fonctions de reproduction.

Ces approches sont complétées *in vivo* par l'utilisation de lignées murines invalidées pour les récepteurs *Fxrα* (*Fxrα*^{-/-}) ou *Tgr5* (*Tgr5*^{-/-}). Ces dernières ont offert la possibilité de discriminer les rôles respectifs de chacun des deux récepteurs aux acides biliaires dans le modèle physiopathologique proposé.

Enfin, l'accès à plusieurs lignées cellulaires dérivées de testicule murin (cellules de Leydig, Ma10 ; cellules de Sertoli, 42GP ; cellules germinales, GC1spg) a permis de préciser sur le plan mécanistique et moléculaire les conclusions obtenues *in vivo*.

Résultats

Article I

Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice.

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Pommier AJ, Houten SM, Marceau G, de Haze A, Baron S, Schoonjans K, Lobaccaro JM, Volle DH

Hepatology, 2014

Bile Acids Alter Male Fertility Through G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor 1 Signaling Pathways in Mice

Marine Baptissart,^{1,2,3,4} Aurélie Vega,^{1,2,3,4} Emmanuelle Martinot,^{1,2,3,4} Aurélien J. Pommier,^{1,2,3,4}
Sander M. Houten,⁵ Geoffroy Marceau,⁶ Angélique de Haze,^{1,2,3,4} Silvère Baron,^{1,2,3,4}
Kristina Schoonjans,⁷ Jean-Marc A. Lobaccaro,^{1,2,3,4} and David H. Volle^{1,2,3,4}

Bile acids (BAs) are signaling molecules that are involved in many physiological functions, such as glucose and energy metabolism. These effects are mediated through activation of the nuclear and membrane receptors, farnesoid X receptor (FXR- α) and TGR5 (G-protein-coupled bile acid receptor 1; GPBAR1). Although both receptors are expressed within the testes, the potential effect of BAs on testis physiology and male fertility has not been explored thus far. Here, we demonstrate that mice fed a diet supplemented with cholic acid have reduced fertility subsequent to testicular defects. Initially, germ cell sloughing and rupture of the blood-testis barrier occur and are correlated with decreased protein accumulation of connexin-43 (Cx43) and N-cadherin, whereas at later stages, apoptosis of spermatids is observed. These abnormalities are associated with increased intratesticular BA levels in general and deoxycholic acid, a TGR5 agonist, in particular. We demonstrate here that *Tgr5* is expressed within the germ cell lineage, where it represses *Cx43* expression through regulation of the transcriptional repressor, T-box transcription factor 2 gene. Consistent with this finding, mice deficient for *Tgr5* are protected against the deleterious testicular effects of BA exposure. **Conclusions:** These data identify the testis as a new target of BAs and emphasize TGR5 as a critical element in testicular pathophysiology. This work may open new perspectives on the potential effect of BAs on testis physiology during liver dysfunction. (HEPATOLOGY 2014;60:1054-1065)

The incidence of infertility is constantly increasing and affects up to 25% of couples. Approximately 50% of the cases comprise disorders of the male reproductive system. They have frequently been associated with an inadequate number and quality of male germ cells (e.g., spermatozoa).^{1,2} Alterations of testicular physiology play an important role in reduced

sperm number, leading to infertility. The major functions of the testes include synthesis of the male sex hormone (testosterone) and production of gametes. Spermatogenesis takes place within the seminiferous tubules in association with the Sertoli cells (SCs), which provide structural support for developing germ cells through cell-cell interactions involving proteins such as

Abbreviations: Abs, antibodies; ALT, alanine aminotransferase; BA, bile acid; BTB, blood-testicular barrier; CA, cholic acid; cDNA, complementary DNA; Cx43, connexin-43; Cyp3a11, cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11; DCA, deoxycholic acid; DHT, dihydrotestosterone; FXR- α , farnesol X receptor; GPBAR1, G-protein-coupled bile acid receptor 1; H&E, hematoxylin and eosin; IHC, immunohistochemistry; Igf1, insulin-like growth factor 1; IP, intraperitoneal; IT, intratesticular; LC, liquid chromatography; LCA, lithocholic acid; MC, mass spectrometry; mRNA, messenger RNA; OA, oleanolic acid; PFA, paraformaldehyde; SCs, Sertoli cells; siRNA small interfering RNA; Sult2a1, sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1; Tbx2, T-box transcription factor 2; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling; Ugt2B34, UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34; WT, wild type.

From the ¹INSERM U 1103, Génétique Reproduction et Développement (GReD), Aubière, France; ²Clermont Université, Université Blaise, Pascal, GReD, BP 80026, Aubière, France; ³CNRS, UMR 6293, GReD, Aubière, France; ⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; ⁵Academic Medical Center, Laboratory Genetic Metabolic Diseases, Amsterdam, The Netherlands; ⁶EA 7281-Retinoids, Reproduction and Developmental Diseases, Laboratoire de Biochimie Médicale, Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand, France; and ⁷Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne, Switzerland.

Received November 14, 2013; accepted May 1, 2014.

This work was funded by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to M.B.), the Swiss National Science Foundation (to K.S.), Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme, to D.H.V.), Nouveau Chercheur Auvergne (to S.B. and no. R12087CC, to D.H.V.), and ANR Jeune Chercheur (no. 1103, to D.H.V.).

N-cadherin, connexin-43 (Cx43), or E-cadherin.³ In a testis, SCs form a blood-testicular barrier (BTB), which is essential for optimal spermatogenesis. Moreover, altered interactions between SCs and germ cells (spermatids) can perturb BTB integrity.^{5,6} These cellular interactions allow orientation of germ cells during differentiation. This is crucial because disorientation may induce germ cell apoptosis.⁷

The urgency in identifying factors altering male fertility is emphasized by the fact that idiopathic infertility represents 25% of cases.⁸ Recently, it was demonstrated *in vivo* that testicular testosterone synthesis was repressed by a synthetic agonist of the nuclear bile acid (BA) receptor, farnesoid X receptor alpha (FXR- α ; NR1H4).⁹ This suggests that BA signaling could play a role in testicular pathophysiology. In addition to their role in promoting digestion, BAs have also been defined as endocrine factors whose actions are mediated by two BA responsive receptors: the nuclear receptor, FXR- α ,¹⁰ and the G-protein-coupled receptor, TGR5 (G-protein-coupled BA receptor; GPBAR1).¹¹ These receptors are currently considered as potential therapeutic targets^{12,13} because they have been demonstrated to be involved in many physiological functions, such as lipid and carbohydrate metabolism¹⁴ as well as energy expenditure.^{15,16} Although FXR- α and TGR5 have been reported to be expressed within the testes,^{9,17} the effect of BA signaling on testis physiology and male fertility remains elusive.

To define the potential effect of BAs on testicular physiology and fertility, we exposed adult male mice to dietary BA supplementation. We demonstrate that mice fed a diet supplemented with cholic acid (CA) have altered fertility subsequent to testicular defects and lower sperm count. Elevated plasma BA levels led to germ cell sloughing and BTB rupture, as well as apoptosis of spermatids. The use of *Tgr5* null (*Tgr5*^{-/-}) mice highlights that the BA-TGR5 pathway plays a critical role in mediating fertility disorders, some of which are mediated within the germ cell lineage.

Materials and Methods

Ethics Statement. This study was conducted in accord with the current regulations and standards

approved by the animal care committee (CEMEA Auvergne; protocol CE 07-12).

Animals. C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), and the *Tgr5*^{-/-} mice used have been previously described.¹⁸ The mice used in this study were maintained in a C57BL/6J background and housed in temperature-controlled rooms with 12-hour light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. Nine-week-old mice were exposed to a D04 diet (control) or D04 diet supplemented with 0.5% CA (CA diet; SAFE, Augy, France) for 0.5, 1, 2, or 4 months.

Histology. After diet exposure, testes were collected, paraformaldehyde (PFA)-fixed and embedded in paraffin, and 5- μ m-thick sections were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E).

For analysis of BTB integrity, 15 μ L of EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (7.5 mg/mL; Thermo Fisher Scientific, Brebières, France) were injected into the left testis of anesthetized males exposed to a control or CA diet.¹⁹ Then, after 20 minutes, testes were removed, PFA-fixed and embedded in paraffin, and 5- μ m-thick sections were prepared and stained for biotin.

For determination of cellular localization of bile acids in the testis, we injected 0.6 mg of cholyl-lysyl-fluorescein (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) either in an intraperitoneal (IP; 200 μ L) or intratesticular (IT; 15 μ L) manner. Thirty minutes after injection, testes were harvested, PFA-fixed and embedded in paraffin, and 5- μ m-thick sections were prepared.

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling Analysis. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) experiments were performed as previously described on 5 μ m of testis fixed in 4% PFA.²⁰ In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted. Results are expressed as the number of tubules with either spermatocytes or spermatids TUNEL positive per 100 seminiferous tubules.

Immunohistochemistry. Paraffin sections of PFA-fixed testis were sectioned at 5 μ m. Sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus; Thermo Scientific), deparaffinized, rehydrated, treated for 20 minutes at 93-98°C in citric buffer (0.01 M, pH 6), rinsed in osmosed water (2 \times 5 minutes),

Address reprint request to: David H. Volle, Ph.D., UMR Inserm U 1103, CNRS 6293, Clermont Université, Génétique Reproduction et Développement, Université Blaise Pascal, BP 80026, F-63170 Aubière, France. E-mail: david.volle@inserm.fr; fax: +33-4-73407042.

Copyright © 2014 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.27204

Potential conflict of interest: Nothing to report.

and washed (2×5 minutes) in Tris-buffered saline. Immunohistochemistry (IHC) was conducted according to the manufacturer's recommendations, as described earlier.²¹ Slides were then counterstained with Hoestch medium (1 mg/mL). Antibodies (Abs) used are given in the Supporting Information (Supporting Table 1).

Endocrine Investigations. Steroids were extracted from testes as previously described.²⁰ IT and plasma steroid levels were measured using commercial kits: testosterone and estradiol (Diagnostic Biochem, London, Ontario, Canada), dihydrotestosterone (DHT), 3α -androstenediol (MyBioSource, San Diego, CA), and androsterone (Antibody-on-line GmbH, Paris, France).

BA Measurements. Plasma BAs were analyzed in acetonitrile-deproteinized samples by liquid chromatography (LC) tandem mass spectrometry (MS/MS) using a method described previously, with minor modifications.²² Quantitative measurement of tissue BAs was performed as described before.²³ The qualitative measurement of the BAs in testis extracts was performed by ultra-pressure LC-MS. The sample was injected into a C₁₈ guard column (20×2 mm) and washed with water; subsequently, BAs and BA conjugates were eluted with acetonitrile in a single peak. During elution of this peak, spectra were taken. For experiments on wild-type (WT) and *Tgr5*^{-/-} mice, BA measurements were performed using enzyme-linked immunosorbent assays, following the manufacturer's recommendations (catalog no.: 80470; Crystal Chem, Inc., Downers Grove, IL).

Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction. RNA from testis samples was isolated using Nucleospin RNA (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA with the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnière Les Bains, France). Real-time polymerase chain reaction measurement of individual cDNAs was performed using SYBR Green dye (Master Mix Plus for SYBR Assay; Eurogentec, Angers, France) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf RealPlex system. The sequences of primers are reported in Supporting Table 2. Standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. Results were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Western Blotting. Proteins were extracted from tissues using lysis buffer (0.4 M of NaCl, 20 mM of Hepes, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of ethylenediami-

netetraacetic acid, 0.1% NP40, and $1\times$ protease inhibitors; Roche Diagnostics, Meylan, France). Abs were suspended in Tri-buffered saline, 0.1% Tween, and 10% milk. The Abs used are given in the Supporting Information (Supporting Table 1).

Cell Studies. GC1-spg cells were used as previously described.⁹ Cells were treated for 24 hours with vehicle (ethanol, 1/1,000), deoxycholic acid (DCA; 5-100 μ M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), lithocholic acid (LCA; 5-20 μ M; Sigma-Aldrich), and oleanolic acid (OA; 2-10 μ M; Interchim, Montluçon, France). Then, cells were harvested 24 hours later, and messenger RNA (mRNA) or protein extractions were performed.

Transient Transfection. GC1-spg cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) using interferin (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) in six-well plates (100,000 cells per well). The siRNA directed against *Tgr5* or T-box transcription factor 2 gene (*Tbx2*), as well as control siRNA (siGfp), was transfected at 5 ng per well. When 48 hours after the transfection had passed, cells were treated with vehicle (ethanol, 1/1,000) or DCA. Then, cells were harvested 24 hours later, and mRNA extractions were performed.

Cellular Localization. To study *Tgr5* cellular localization within the testis, we used a classical transitory germ-cell loss protocol with busulfan injections.²⁴ C57BL/6J mice were injected once with 20 mg/kg of busulfan (Sigma-Aldrich). Mice were killed on the day of injection (T0), 4 weeks, or 8 weeks after treatment. For details, see Materials and Methods section in the Supporting Information. We also used spermatocytes, which were isolated and purified as previously described.²⁰

Statistical Analysis. For statistical analysis, 2-way ANOVA was performed using the statistical software package SigmaStat 3.0. When significant effects of treatment or genotype or their interactions were obtained, multiple comparisons were made with Holm-Sidak method. All numerical data are mean \pm SEM. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

Results

Dietary BA Supplementation Alters Male Reproductive Function. To define the potential effect of BAs on testicular physiology and fertility, we exposed adult male mice to dietary CA supplementation (0.5%) for 4 months. A CA diet led to altered fertility, with 24% of the exposed males unable to produce progeny (Fig. 1A). In males producing progeny, a CA diet also decreased (20%) the number of pups per litter after 4 months of diet (Fig. 1A). This decrease was negatively correlated with the increase in plasma BA

levels ($r^2 = -0.890$; $P = 0.000565$; Fig. 1B). As expected, CA diet increased plasma BA levels (Supporting Fig. 1A). Although CA was the most abundant BA species, DCA and its derivatives were the most highly induced after the CA diet (Supporting Fig. 1B). The decrease of number of pups per litter in CA-diet-fed males was correlated with DCA levels ($r^2 = -0.895$; $P = 0.000468$; Fig. 1B). The reduced fertility was also associated with a lower production of spermatozoa by the testis (Fig. 1C).

Dietary BA Supplementation Alters Germ Cell Survival. A marked increase in germ cell apoptosis, specifically spermatids, was observed after 4 months of CA diet (Fig. 2A,B) and was associated with an induction of cleaved caspase-3 (Fig. 2C). No modification of IT testosterone or other male hormones, such as DHT, androsterone, and 3α -androstenediol, was observed (Fig. 2D and Supporting Fig. 1C). Moreover, gene expression levels of several androgen-dependent genes (*Pem* and *Osp1*) were not changed after 4 months of CA diet (Fig. 2E). These results suggest that androgen-independent mechanisms may underlie apoptotic events in spermatids of male mice exposed to BAs. Interestingly, IHC analysis indicated abnormal polarization of elongating/elongated spermatids in mice exposed to BAs, compared to the control group (Fig. 2E,G).

Integrity of the Seminiferous Epithelium Is Altered Upon Chronic BA Exposure. Histological analyses revealed the presence of cell aggregates in the center of the seminiferous tubules (Fig. 3A,B) as well as destructured tubules (Fig. 3C,D) in testes of the CA-treated group. Whereas cell aggregates were already observed after 2 months of diet, the presence of destructured tubes only appeared after 4 months (Fig. 3B,D). This suggests that cell-cell interaction mechanisms could have been altered by the CA diet, resulting in germ cell detachment.

Use of a biotin-coupled tracer indicated that, after 2 months of diet, the BTB is no longer intact (Fig. 3E,F). Analysis of cell-cell interaction proteins indicated a decreased accumulation of N-cadherin and Cx43 after 2 months of BA exposure (Fig. 3G,H), whereas SRC, claudin-5, $\beta 1$ -integrin, β -catenin, nectin-3, and vimentin were not affected (Supporting Fig. 1D). Furthermore, *Cx43* mRNA accumulation was already altered after 15 days of CA diet exposure, whereas *N-cadherin* mRNA accumulation was unchanged (Supporting Fig. 1E).

TGR5 Deficiency Protects Males From BA-Induced Testis Abnormalities. In contrast to WT males, *Tgr5*^{-/-} males did not display any effect on male reproductive efficiency (Fig. 4A, left panel). Both the number of pups per litter and the number of spermatozoa in *Tgr5*^{-/-} males were not reduced in

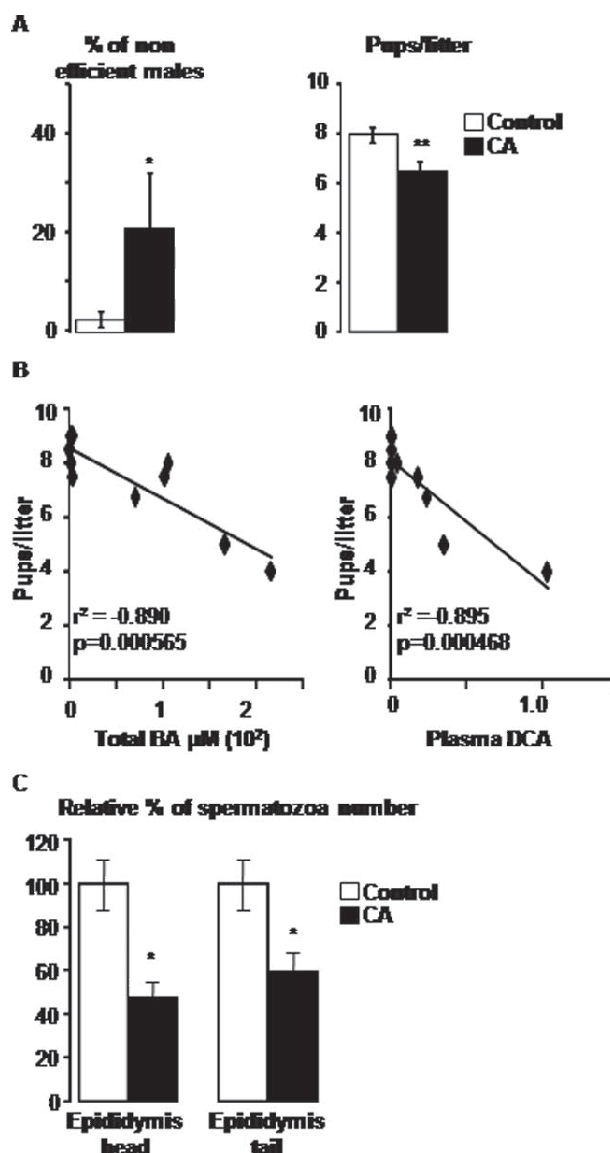


Fig. 1. CA diet induces male hypofertility. (A) Each male was bred with 2 C57Bl/6J females to analyze their capacity to mate (percentage of non-efficient males; left panel) and number of pups per litter obtained (right panel). (B) Correlation of the number of pups per litter with the concentration of total plasma BAs and DCA. (C) Spermatozoa count in the heads and tails of the epididymis of males exposed to 4 months of control or CA diets ($n = 10$ –20 per group). Control diet group was arbitrarily fixed at 100%. In all of the panels, data are expressed as the means \pm standard error of the mean. Statistical analysis: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

response to 4 months of CA diet (Fig. 4A, right panel, and 4B), indicating that the effects of chronic BA exposure on male reproductive functions are *Tgr5* dependent. Moreover, no morphological abnormalities from chronic CA feeding, such as cell center aggregates or destructured tubules, could be observed in the testis of *Tgr5*^{-/-} males (Fig. 4C). Consistently, no effect was observed on BTB integrity, apoptosis levels, or

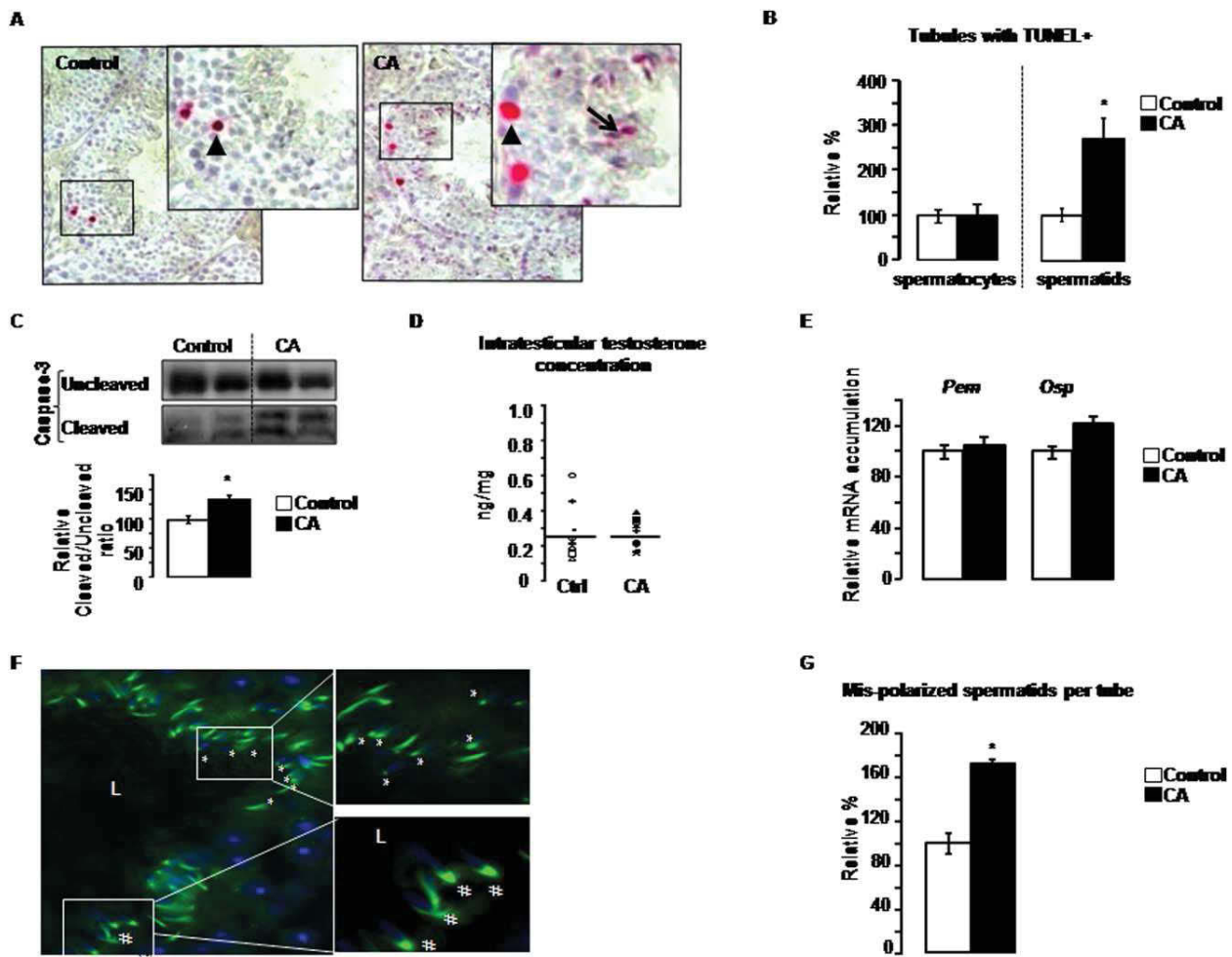


Fig. 2. CA diet induces germ cell apoptosis. (A) Apoptosis in mice exposed to control or CA diets ($n = 10$ – 20 per group) analyzed by TUNEL staining. Representative micrographs of the testis exposed to control or CA diets. Arrowheads indicate apoptotic spermatocytes; arrow indicates apoptotic spermatids. The original magnification was $200\times$. (B) Quantification of TUNEL analyses. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules; the number of tubules with TUNEL-positive spermatids is indicated as the number of positive tubules per 100 seminiferous tubules ($n = 10$ – 20). Control-diet-treated mice were arbitrarily fixed at 100%. (C) Immunoblotting of cleaved caspase-3 performed on testicular protein extracts of mice fed a control or CA diet ($n = 6$ – 10 per group). Quantification of cleaved caspase-3 protein accumulation, compared to uncleaved caspase-3. Control-diet-treated mice were arbitrarily fixed at 100%. (D) IT testosterone concentration (ng/mg) in C57Bl/6J mice fed a control or CA diet for 4 months ($n = 6$ – 20 per group). (E) Testicular mRNA expression of *Pcm* and *Osp* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diet for 0.5 or 4 months ($n = 10$ – 15 per group). (F) Spermatid orientation, as measured by the stained cells for E-cadherin. Representative micrographs of mice fed 4 months with CA diet ($n = 10$ – 15 per group). #Indicates well-oriented spermatids; *indicates misoriented spermatids. The original magnification was $100\times$. (G) Quantification of the number of tubules with misoriented spermatids per 100 seminiferous tubules after 4 months of control or CA diet ($n = 10$ – 15 per group). Control-diet-treated mice were arbitrarily fixed at 100%. L, lumen. In all of the panels, data are expressed as the means \pm standard error of the mean. Statistical analysis: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

misoriented spermatids in *Tgr5*^{−/−} males after BA exposure (Fig. 4D). In addition, *Tgr5*^{−/−} mice exposed to a CA diet did not display decreased N-cadherin and Cx43 protein levels (Fig. 4E,F). Regarding Cx43, the protective effect of the lack of *Tgr5* was also observed at the mRNA level (Supporting Fig. 1F).

The Testicular Phenotype Is Not Initiated by Altered Liver Injury or Testosterone/Insulin-Like Growth Factor 1 Levels. The effects of prolonged BA exposure on male reproductive functions are

dependent on the BA receptor TGR5, because *Tgr5*^{−/−} mice are protected against the observed deleterious testicular effects. One could have hypothesized that differences in the extent of liver injury, induced by chronic CA feeding, contribute to the improved testicular physiology in *Tgr5*^{−/−} males. However, consistent with a previous study,²⁵ body and liver weight were not different between *Tgr5*^{+/+} and *Tgr5*^{−/−} males in response to BA exposure (Supporting Fig. 2A). Furthermore, plasma alanine aminotransferase

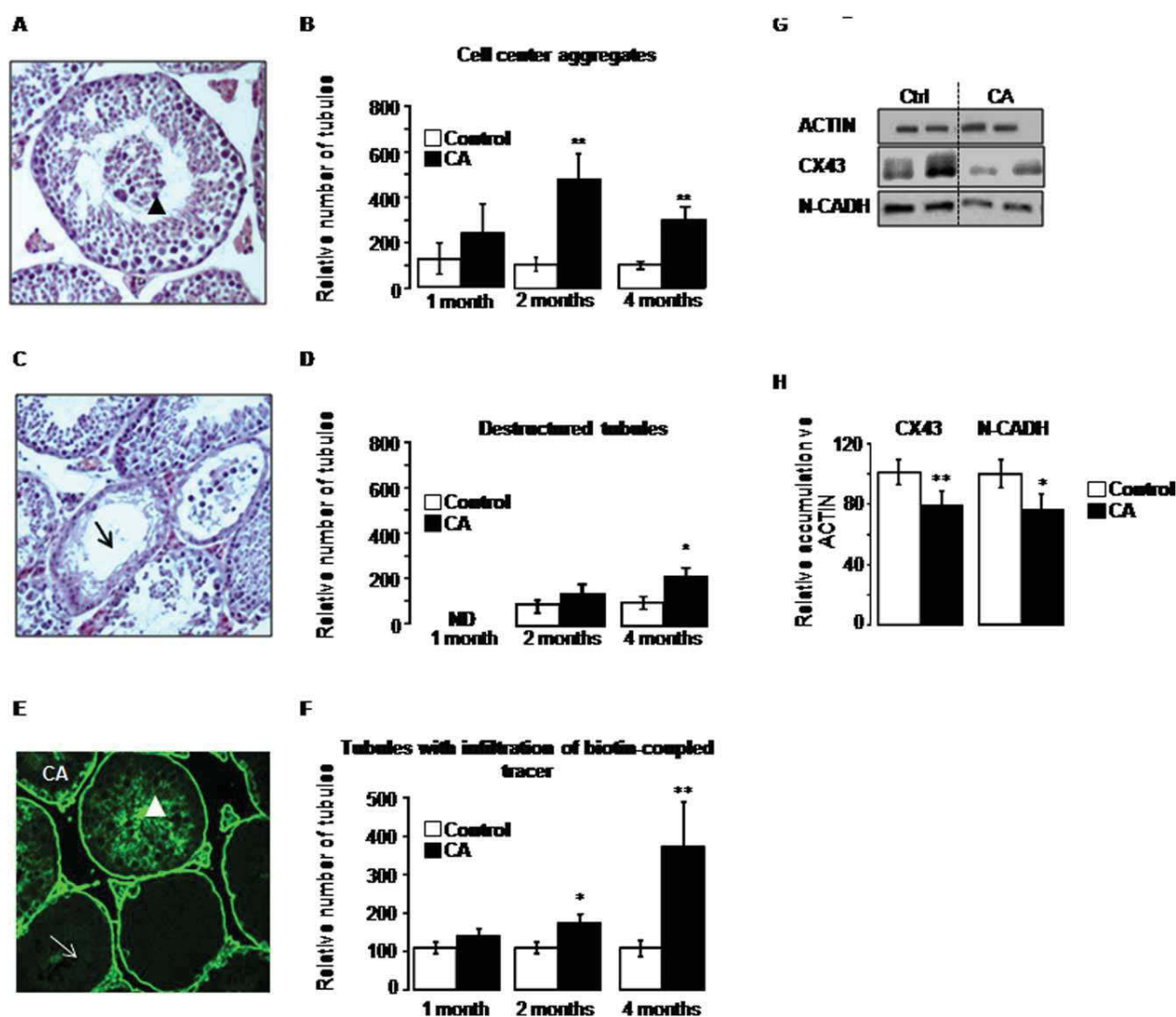


Fig. 3. CA diet impairs seminiferous epithelium integrity through the down-regulation of *connexin-43* and *N-cadherin*. (A) Representative micrographs of H&E-stained testes of mice fed a CA diet for 4 months ($n = 10-20$ per group). Arrowhead indicates tubules with sloughing germ cells. The original magnification was $100\times$. (B) Quantification of the number of tubules with sloughing germ cells tubules per 100 seminiferous tubules after 1, 2, and 4 months of control or CA diets ($n = 10-20$ per group). (C) Representative micrographs of H&E-stained testes of mice fed a CA diet for 4 months ($n = 10-20$ per group). Arrows indicate tubes with complete loss of germ cells. The original magnification was $100\times$. (D) Quantification of the number of completely destroyed tubules per 100 seminiferous tubules after 1, 2, and 4 months of control or CA diets ($n = 10-20$ per group). (E) BTB integrity, as measured by the stained testes for EZ-link biotinylated. Representative micrographs of mice fed 4 months with a control diet or CA diet ($n = 10-15$ per group). Arrow indicates a tubule with a slight infiltration of EZ-link biotinylated; arrowhead indicates a tubule with a high intensity of infiltration. The original magnification was $100\times$. (F) Quantification of the number of tubules with infiltration per 100 seminiferous tubules after 1, 2, and 4 months of a control or CA diet ($n = 10-15$ per group). (G) Immunoblottings of connexin-43 and N-cadherin protein accumulations, compared to actin, performed on testicular protein extracts of mice fed a control or CA diet for 2 months ($n = 10-20$ per group). (H) Quantification of connexin-43 and N-cadherin protein accumulations, compared to actin. In all panels, data are expressed as the means \pm standard error of the mean. Statistical analysis: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control diet group. In all panels, control-diet-treated mice were arbitrarily fixed at 100%.

(ALT) levels and cytokeratin-8 were similarly increased in both genotypes after CA diet exposure (data not shown), suggesting a similar extent of liver injury in both genotypes.

Reduced plasma testosterone levels have been associated with liver diseases.^{26,27} In our experimental model, lower testosterone levels were initially observed

1 month after initiation of the CA diet (Fig. 5A). This was also reflected by the lower weight of the seminal vesicles (Fig. 5B), which is an androgen-dependent organ. The lower plasma testosterone levels appear to be correlated with altered hepatic catabolism, as suggested by the higher mRNA accumulation of genes such as UDP glucuronosyltransferase 2 family,

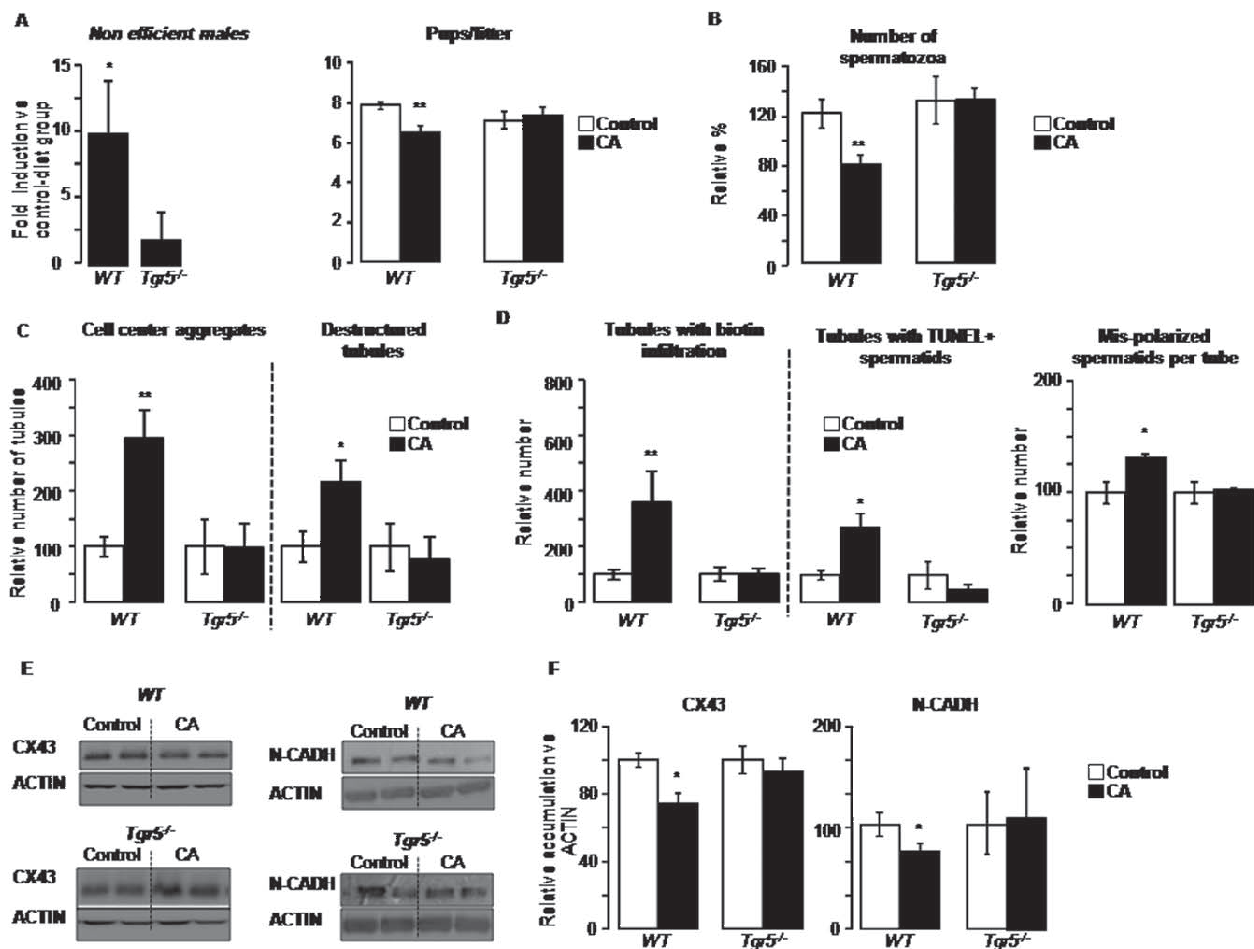


Fig. 4. *Tgr5* deficiency protects male mice from CA-diet-induced testicular abnormalities. (A) After 4 months of diet, each male of either WT or *Tgr5*^{-/-} genotype was bred with 2 C57Bl/6J females to analyze their reproductive efficiency (fold increase of number of infertile males vs. control diet group) and the number of pups per litter ($n = 6-10$ per group); data are expressed as the means \pm standard error of the mean. *Denotes significant difference from the control diet group for same genotype (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). (B) Spermatozoa count in the tail of epididymis of WT or *Tgr5*^{-/-} males exposed to 4 months of a control or CA diet ($n = 10-20$ per group). Control diet groups were arbitrarily fixed at 100% (** $P < 0.01$). (C) Quantification of the number of tubules with sloughing germ cells or completely destructured tubules per 100 seminiferous tubules in WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 4 months ($n = 6-10$ per group). Control-diet-treated mice were arbitrarily fixed at 100%. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. (D) Quantification of the number of tubules with biotin infiltration; quantification of the number of tubules with TUNEL-positive spermatids; and quantification of the number of tubules with misoriented spermatids. For all parameters, 100 seminiferous tubules per mice were analyzed after 4 months in WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet ($n = 6-15$ per group). Data are expressed as the means \pm standard error of the mean. *Denotes significant difference from the control diet group for the same genotype (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$). (E) Immunoblotting of Cx43 and N-cadherin performed on testicular protein extracts of WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 2 months ($n = 10-15$ per group). (F) Quantification of Cx43 and N-cadherin protein accumulations, compared to actin. Data are expressed as the means \pm standard error of the mean. *Denotes significant difference from the control diet group for the same genotype ($P < 0.05$).

polypeptide B34 (*Ugt2b34*), cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 11 (*Cyp3a11*; Fig. 5C), and sulfotransferase family, cytosolic, 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 1 (*Sult2a1*; data not shown). However, the reduction of plasma testosterone after CA exposure may not be critically involved in the altered fertility and sperm production, as it was also observed in *Tgr5*^{-/-} males (Fig. 5A). This result was further supported by the effect of the CA diet on seminal vesicles in *Tgr5*^{-/-} males (Fig. 5B). In addition, no

effect of the CA diet or *Tgr5* genotype was observed on other hormones, such as DHT, 3 α -androstadiol, androsterone, or estradiol (Supporting Fig. 2B).

In addition, decreased levels of hepatic insulin-like growth factor 1 (*Igf1*) mRNA, a factor described to alter the BTB and a known inducer of *Cx43* expression, were also observed in WT males exposed to a CA diet. This decrease was observed from 15 days after beginning of BA exposure (Fig. 5D), a time when *Cx43* was already decreased at the mRNA level

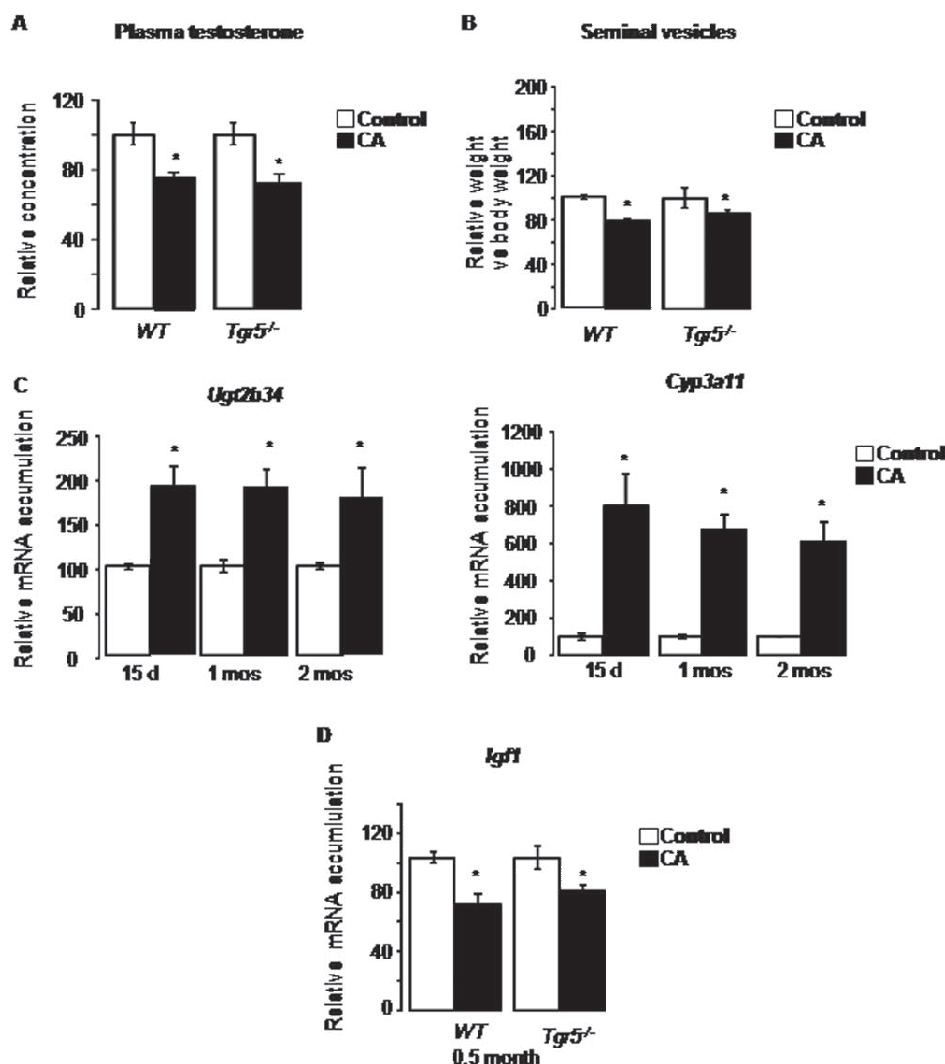


Fig. 5. Systemic effects are not involved in fertility disorders mediated by *Tgr5*. (A) Relative plasma testosterone levels in WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 1 month (n = 6–10 per group). (B) Seminal vesicle weights normalized to body weight in WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 1 month (n = 6–20 per group). (C) Hepatic mRNA expression of *Ugt2b34* and *Cyp3a11* normalized to β -actin mRNA levels in whole testis of WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 0.5 month (n = 6 to 15 per group; **P* < 0.05). (D) Hepatic mRNA expression of *Igf1* normalized to β -actin mRNA levels in WT and *Tgr5*^{-/-} mice fed a control or CA diet for 15 days (n = 6 per group). In all panels, control diet groups were arbitrarily fixed at 100%. In all panels, data are expressed as means \pm standard error of the mean. Statistical analysis: **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.005.

(Suppl. 1E). Interestingly, *Tgr5*^{-/-} males displayed a similar alteration of *Igf1* mRNA accumulation after CA diet exposure (Fig. 5D). These results suggest that *Igf1* is not critically involved in the initiation of the reproductive disorders.

The Effect on Cell-Cell Interactions Is Mediated, in Part, Through Activation of TGR5 in Germ Cells by Testicular Bas. We then analyzed whether BAs can directly act through TGR5 in the testis. Using a fluorescein-coupled BA (Fig. 6A),²⁹ we observed that BAs were able to reach the testis by blood circulation and were mainly localized in the interstitial compartment in mice with an intact BTB. In contrast to males

of the control group, males fed for 4 months with a CA diet displayed fluorescence within the seminiferous epithelium (Fig. 6B). Using MS, we demonstrated that BA levels were increased in WT males exposed to a CA diet (Fig. 6C). A similar increase was observed in *Tgr5*^{-/-} males after BA exposure (Supporting Fig. 3A). Altered fertility was correlated with IT levels of DCA (Fig. 6D).

Because of the lack of reliable Abs to detect mouse TGR5 in testes by IHC, we analyzed the expression pattern of testicular *Tgr5* using the classical ontogeny approach. Unlike the somatic markers, *Fshr* (SCs) and *Lhcgr* (Leydig cells), whose expression peaked at 5 and 25 dpn, respectively, *Tgr5*, as well as the germ cell marker,

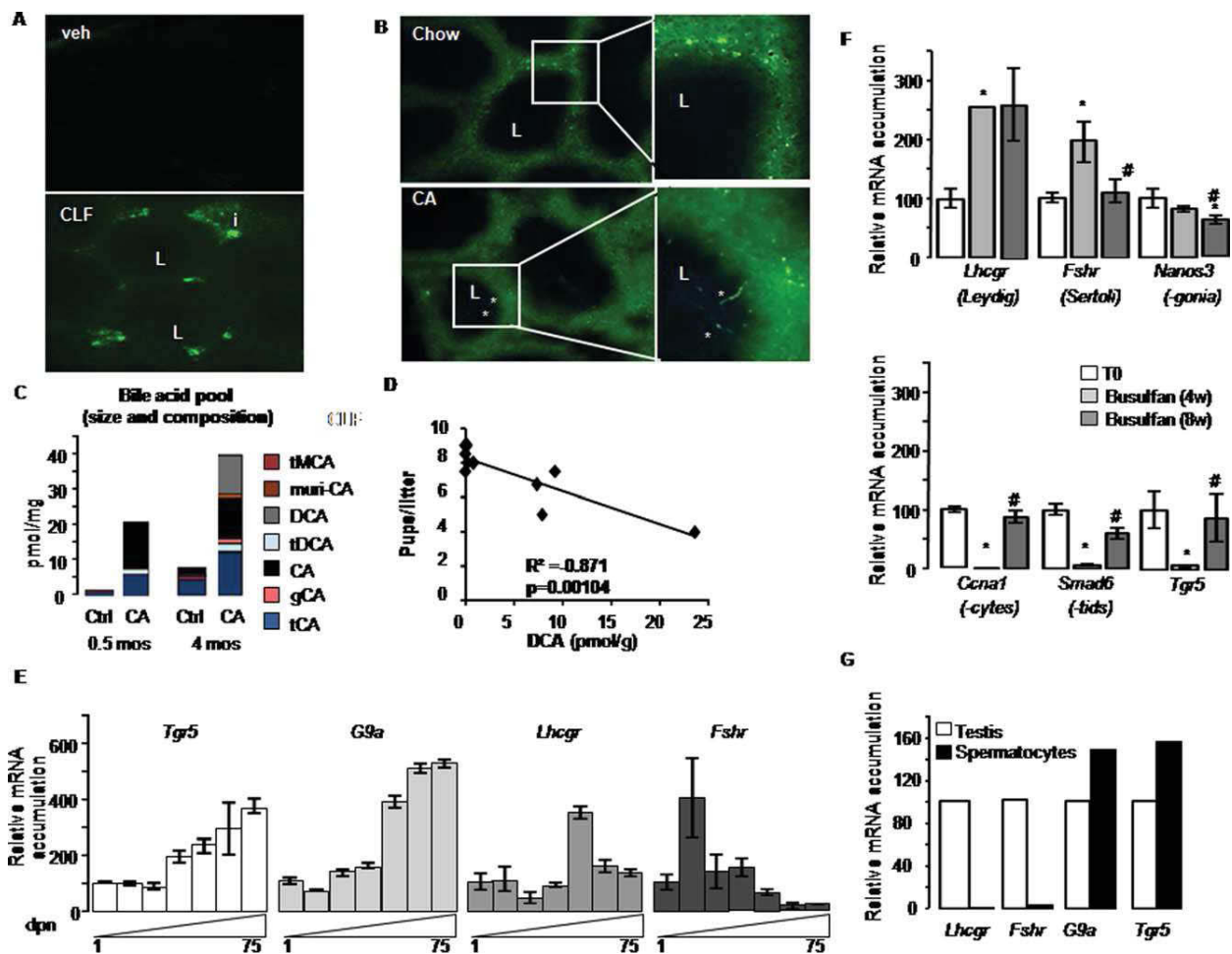


Fig. 6. Intratesticular BAs and expression of *Tgr5* in germ cells support the hypothesis of an active signaling pathway in the testis. (A) Analyses of BA localizations in the testis, as monitored by the IP injection of cholyl-L-lysyl-fluorescein (CLF; 0.6 mg/mice) or vehicle (phosphate-buffered saline [PBS] 1×) for 30 minutes. Representative micrographs of the stained testes of PBS- or CLF-injected mice. The original magnification was 200×. (B) Analyses of BA localizations in the testis, as monitored by IT injection of CLF (0.6 mg/mice) for 30 minutes in mice fed a control or CA diet for 4 months. Representative micrographs of the stained testes of PBS- or CLF-injected mice. The original magnification was 200×. (C) IT BA pool size and composition in mice fed a control or CA diet for 0.5 or 4 months ($n = 5$ per group). (D) Correlation of the number of pups per litter with the concentration of IT DCA concentration. (E) Testicular mRNA accumulation of *Tgr5*, *G9a*, *Lhcgr*, and *Fshr* normalized to β -actin mRNA levels in whole testes of C57BL/6J from 1 to 75 days old. Data are expressed as the means \pm standard error of the mean. (F) Testicular mRNA accumulation of *Lhcgr*, *Fshr*, *Nanos3*, *Ccna1*, *Smad6*, and *Tgr5* normalized to β -actin mRNA levels in whole testes of C57BL/6J mice treated with busulfan (20 mg/kg, one injection IP) at T0, 4, or 8 weeks ($n = 8$ per group). Data are expressed as means \pm standard error of the mean. *Denotes significant difference from the T0 time point; #denotes significant difference from the 4-week time point ($P < 0.05$). (G) mRNA accumulation of *Lhcgr*, *Fshr*, *G9a*, and *Tgr5* normalized to β -actin levels in purified spermatocytes of adult C57BL/6J mice.

G9a, progressively accumulated over time (Fig. 6E). This may point to the possibility that *Tgr5* is expressed in germ cells. We also analyzed *Tgr5* in a model of germ cell loss (Fig. 6F and Supporting Fig. 3B).²⁴ Germ cell loss induced by busulfan exposure and subsequent recolonization of the epithelium were confirmed by analyzing the weight and histology of the testis (Supporting Fig. 2B) as well as by analyzing specific markers of Sertoli (*Fshr*), Leydig (*Lhcgr*), and germ cells at different steps of spermatogenesis (*Nanos*, *Ccna1*, and *Smad6*; Fig. 6F). The expression pattern indicated that *in vivo* *Tgr5* is mainly expressed in germ cells (Fig. 6F). In addition, as

for the germ cell marker, *G9a*, *Tgr5* mRNA expression was detected in purified spermatocytes (Fig. 6G).

To determine whether BAs can act directly on germ cells through TGR5, we exposed the germ cell line, GC1spg, to a panel of TGR5 agonists, including LCA,³⁰ OA,³¹ and DCA³⁰ (Fig. 7A). Interestingly, all agonists repressed Cx43 protein accumulation at concentrations that were in line with the reported EC values (Fig. 7A). Moreover, introduction of a specific siRNA directed against *Tgr5* (Supporting Fig. 4A) abolished the reduction of Cx43 by DCA (Fig. 7B). Moreover, in untreated cells, *Tgr5* silencing induced

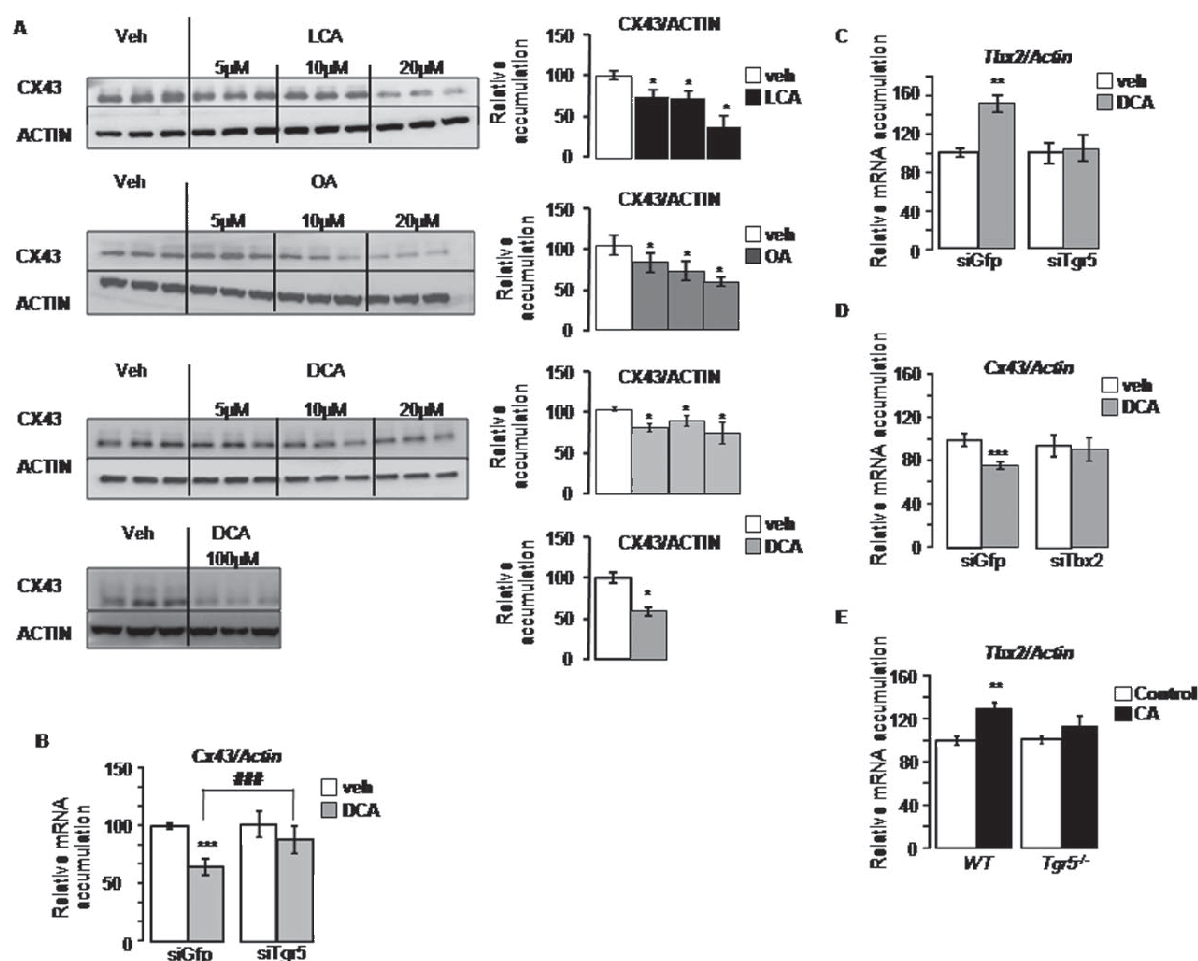


Fig. 7. TGR5 controls Cx43 accumulation through a TBX2 pathway. (A) Cx43 protein accumulation levels normalized to actin in the GC1spg germ cell line exposed to vehicle (ethanol) or DCA, LCA, or OA over 24 hours ($n = 18$ per group). Vehicle-treated cells were arbitrarily fixed at 100%. (B) mRNA expression of Cx43 normalized to β -actin levels in GC1spg germ cell lines transfected with siGfp or siTgr5 and exposed to vehicle or DCA during 24 hours ($n = 15$ per group). *Denotes difference from the siGfp vehicle group; #denotes difference from the siGfp DCA group. siGfp vehicle-treated cells were arbitrarily fixed at 100% for each siRNA condition. (C) mRNA expression of Tbx2 normalized to β -actin levels in GC1spg germ cell lines transfected with siGfp or siTgr5 and exposed to vehicle or DCA during 24 hours ($n = 15$ per group). Vehicle-treated cells were arbitrarily fixed at 100% for each siRNA condition. (D) mRNA expression of Cx43 normalized to β -actin levels in GC1spg germ cell line transfected with siGfp or siTbx2 and exposed to vehicle or DCA over 24 hours ($n = 12$ per group). Vehicle-treated cells were arbitrarily fixed at 100% for each siRNA condition. (E) Testicular mRNA expression of Tbx2 normalized to β -actin mRNA levels in whole testes of WT and Tgr5^{-/-} mice fed a control or CA diet for 15 days ($n = 12$ to 20 per group). Control diet groups were arbitrarily fixed at 100%. In all panels, data are expressed as means \pm standard error of the mean. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

an increase of Cx43 mRNA accumulation, compared to siGfp (Suppl. 4B).

The Cx43 gene has been reported to be repressed by several transcription factors, including TBX2.³³ Consistent with the kinetics of Cx43 regulation, Tbx2 expression was induced 6 hours after DCA exposure (Supporting Fig. 4C) and remained increased up to 24 hours (Fig. 7C). Induction of Tbx2 mRNA was absent in cells transfected with siTgr5, compared with cells transfected with control siGfp (Fig. 7C). Moreover, involvement of TBX2 was confirmed through use of a specific siRNA directed against Tbx2 (Supporting Fig. 4D) that prevented the effects of DCA on Cx43 expression (Fig. 7D). Consistent with these

cell-based studies, Tbx2 mRNA also accumulated *in vivo* in the testis after 2 weeks of the CA diet (Fig. 7E), whereas Cx43 mRNA accumulation decreased (Supporting Fig. 1E). Moreover, these effects were lost in Tgr5^{-/-} mice (Fig. 7E), supporting the hypothesis of a DCA-TGR5-Tbx2-Cx43 signaling axis.

Discussion

Here, we demonstrated that chronic exposure to elevated BA levels leads to reduced male fertility along with significantly lower production of spermatozoa. We demonstrated that mice fed a diet supplemented

with CA exhibit germ cell sloughing and BTB rupture, as well as apoptosis of spermatids, and that these effects are reversed in mice deficient for *Tgr5*. These results strongly indicate that constitutively active BA-TGR5 signaling may alter testicular epithelium integrity. The morphological abnormalities, exemplified by cell detachment and destructured tubules, that are observed after long-term treatment with BAs are, in fact, highly reminiscent of the infertility observed in humans and mouse models after portacaval shunting³⁴ or exposure to endocrine disruptors,^{35,36} suggesting that these alterations might be involved in the observed altered reproductive functions induced by the CA diet.

Although CA-fed animals displayed lower plasma testosterone levels, most likely the result of altered hepatic catabolism of testosterone, the lack of any effect of CA exposure on testicular testosterone synthesis was rather unexpected. We previously reported that the BA-responsive nuclear receptor, FXR- α , represses testicular steroidogenesis after short exposure to FXR- α synthetic agonists.⁹ This apparent discrepancy might be related to the difference in the potency of CA diet and GW4064 in activating FXR- α or, alternatively, may depend on duration of treatment, which was significantly different between both studies.⁹ Furthermore, the absence of any major difference in IT testosterone synthesis was consistent with our germ cell phenotype. In fact, it has been well established that a decrease in IT testosterone triggers apoptosis during the stage of spermatocyte development,²⁰ whereas, in our study, apoptosis was detected in spermatids.

Our study revealed that *Tgr5* is expressed within the germ cell lineage, where it represses *Cx43* expression through regulation of the transcriptional repressor, *Tbx2*. Numerous studies have highlighted the importance of Cx43 and N-cadherin in testicular physiology to maintain the number of germ cells.³⁷⁻⁴⁰ Based on our findings, we propose that the concomitant decrease of Cx43 and N-cadherin may account for germ cell sloughing and BTB alteration after BA exposure. This function of TGR5 in germ cells is consistent with recent studies indicating that interactions between SCs and germ cells (spermatids) can perturb BTB integrity.^{5,6} Moreover, animals treated with BAs presented incorrectly oriented spermatids, which could also be associated with spermatid apoptosis.⁷

Even though systemic factors, such as testosterone and IGF-1, can, in theory, induce male infertility, our data rather disfavor this possibility in our model. Instead, the results obtained from our studies in *Tgr5*^{-/-} males support the idea that BAs could directly affect testicular physiology through TGR5 in

germ cells. Indeed, we observed that BAs are present in the testis and that their concentrations are increased under CA-diet exposure. Such an increase was observed in both *Tgr5*^{+/+} and *Tgr5*^{-/-} males. This suggests that the lower response to the CA diet in the testes of *Tgr5*^{-/-} mice in terms of N-cadherin and Cx43 protein accumulation was not the result of altered BA levels, but rather the absence of an active TGR5-signaling pathway. It is interesting to note that DCA is the BA displaying the highest fold increase after CA-diet exposure in the testes. Of all naturally occurring BAs, DCA is one of the most potent agonists for TGR5.^{30,31} This finding is consistent with a role for TGR5 in the CA-induced deleterious effects on testis physiology. DCA is a secondary BA that originates from the intestinal transformation of CA by bacterial flora, suggesting that an intact enterohepatic cycle is required to induce the testicular-deleterious effects. Intriguingly, DCA plasma and IT concentrations were negatively correlated with the number of pups per litter from CA-exposed males, further corroborating the importance of DCA in this process. Additional studies will be necessary to confirm whether DCA may have similar effects on male fertility and function in humans.

Our work suggests a key role for TGR5 within the testis where TGR5 may potentially be activated by BAs in pathological conditions with increased BA levels, but the physiological ligands remain to be defined. However, it is interesting to note that TGR5 has been demonstrated to be activated by some steroids that may be relevant in testicular physiology, such as androsterone and androstandiol, which may be natural testicular ligands of TGR5.³¹ More work will be required to assess the contribution of these steroids to TGR5 function during testicular development and physiology. Finally, it is worth mentioning that several correlations exist in humans between liver diseases and altered male fertility.^{41,42} Given that many liver diseases are characterized by a severely impaired BA homeostasis, it is tempting to speculate that pathological BA levels in serum may initiate testicular alterations during the early stages of liver dysfunction and subsequently promote subfertility. In this context, plasma BA concentrations and pool composition may offer promising tools for early diagnosis of testicular subfertility in patients with liver diseases. Although more human studies are warranted to corroborate this correlation in humans, our mouse studies provide strong indications for a deleterious effect of chronic BA exposure on testicular pathophysiology and fertility disorders.

References

- Skakkebaek NE, Meyts ERD, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Opin Hum Reprod* 2001;16:972-978.
- Sharpe RM, Irvine DS. How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ* 2004;328:447-451.
- Yan HHN, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cross-talk between tight and anchoring junctions-lesson from the testis. *Adv Exp Med Biol* 2008;636:234-254.
- Dohle GR, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Jungwirth A, Weidner W. EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol* 2005;48:703-711.
- Cheng CY, Lie PP, Mok KW, Cheng YH, Wong EW, Mannu J, et al. Interactions of laminin $\beta 3$ fragment with $\beta 1$ -integrin receptor: A revisit of the apical ectoplasmic specialization-blood-testis-barrier-hemidesmosome functional axis in the testis. *Spermatogenesis* 2011;1:174-185.
- Su L, Mruk DD, Lie PPY, Silvestrini B, Cheng CY. A peptide derived from laminin- $\gamma 3$ reversibly impairs spermatogenesis in rats. *Nat Commun* 2012;3:1185.
- Chang YF, Lee-Chang JS, Harris KY, Sinha-Hikim AP, Rao MK. Role of β -catenin in post-meiotic male germ cell differentiation. *PLoS One* 2011;6:e28039.
- Abdel Raheem A, Ralph D, Minhas S. Male infertility. *Br J Med Surg Urol* 2012;5:254-268.
- Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro JMA, et al. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 2007;21:303-315.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 1999;284:1362-1365.
- Houten SM, Watanabe M, Auwerx J. Endocrine functions of bile acids. *EMBO J* 2006;25:1419-1425.
- Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:678-693.
- Moore DD, Kato S, Xie W, Mangelsdorf DJ, Schmidt DR, Xiao R, et al. International Union of Pharmacology. LXII. The NR1H and NR1I receptors: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, farnesoid X receptor alpha, farnesoid X receptor beta, liver X receptor alpha, liver X receptor beta, and vitamin D receptor. *Pharmacol Rev* 2006;58:742-759.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 2009;89:147-191.
- Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, et al. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006;439:484-489.
- Baptissart M, Vega A, Maqdashy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JMA, et al. Bile acids: from digestion to cancers. *Biochimie* 2013;95:504-517.
- Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, et al. Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:714-719.
- Pols TWH, Nomura M, Harach T, Lo Sasso G, Oosterveer MH, Thomas C, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab* 2011;14:747-757.
- Morrow CMK, Tyagi G, Simon L, Carnes K, Murphy KM, Cooke PS, et al. Claudin 5 expression in mouse seminiferous epithelium is dependent upon the transcription factor ets variant 5 and contributes to blood-testis barrier function. *Biol Reprod* 2009;81:871-879.
- Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007;21:1014-1027.
- Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, et al. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3752-3764.
- Bootsma AH, Overmars H, van Rooij A, van Lint AE, Wanders RJ, van Gennip AH, et al. Rapid analysis of conjugated bile acids in plasma using electrospray tandem mass spectrometry: application for selective screening of peroxisomal disorders. *J Inher Metab Dis* 1999;22:307-310.
- Ferdinandusse S, Denis S, Overmars H, Van Eeckhoudt L, Van Veldhoven PP, Duran M, et al. Developmental changes of bile acid composition and conjugation in L- and D-bifunctional protein single and double knockout mice. *J Biol Chem* 2005;280:18658-18666.
- Zohni K, Zhang X, Tan SL, Chan P, Nagano MC. The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. *Hum Reprod* 2012;27:44-53.
- Péan N, Doignon I, Garcin I, Besnard A, Julien B, Liu B, et al. The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *HEPATOLOGY* 2013;58:1451-1460.
- Foresta C, Schipilliti M, Ciarleglio FA, Lenzi A, D'Amico D. Male hypogonadism in cirrhosis and after liver transplantation. *J Endocrinol Invest* 2008;31:470-478.
- Guéchet J, Chazouillères O, Loria A, Hannoun L, Balladur P, Parc R, et al. Effect of liver transplantation on sex-hormone disorders in male patients with alcohol-induced or post-viral hepatitis advanced liver disease. *J Hepatol* 1994;20:426-430.
- De Waart DR, Häusler S, Vlaming MLH, Kunne C, Hänggi E, Gruss HJ, et al. Hepatic transport mechanisms of cholesteryl-L-lysyl-fluorescein. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:78-86.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al. A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem* 2003;278:9435-9440.
- Sato H, Macchiarulo A, Thomas C, Gioiello A, Une M, Hofmann AF, et al. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. *J Med Chem* 2008;51:1831-1841.
- Chen JR, Chatterjee B, Meyer R, Yu JC, Borke JL, Isales CM, et al. Tbx2 represses expression of Connexin43 in osteoblastic-like cells. *Calcif Tissue Int* 2004;74:561-573.
- Zaitoun AM, Apelqvist G, Wikell C, Al-Mardini H, Bengtsson F, Record CO. Quantitative studies of testicular atrophy following porta-caval shunt in rats. *HEPATOLOGY* 1998;28:1461-1466.
- Alam MS, Ohsako S, Tay TW, Tsunekawa N, Kanai Y, Kurohmaru M. Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat sertoli cells: a possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anat Histol Embryol* 2010;39:186-193.
- Yao PL, Lin YC, Richburg JH. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod* 2010;82:516-527.
- Chevallier D, Carette D, Segretain D, Gilleron J, Pointis G. Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases. *Cell Mol Life Sci* 2012 Sep 4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22918484>.
- Boogerd KJ, Wong LY, Christoffels VM, Klarenbeek M, Ruijter JM, Moorman AFM, et al. Mx1 and Mx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43. *Cardiovasc Res* 2008;78:485-493.
- Borke JL, Chen JR, Yu JC, Bollag RJ, Orellana MF, Isales CM. Negative transcriptional regulation of connexin 43 by Tbx2 in rat immature coronal sutures and ROS 17/2.8 cells in culture. *Cleft Palate Craniofac J* 2003;40:284-290.
- Cheng CY, Mruk DD. The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol Rev* 2012;64:16-64.
- Zhou XP, Hu XL, Zhu YM, Qu F, Sun SJ, Qian YL. Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B. *Asian J Androl* 2011;13:465-469.
- Hofny ER, Ali ME, Taha EA, Nafeh HM, Sayed DS, Abdel-Azeem HG, et al. Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil Steril* 2011;95:2557-2559.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website.

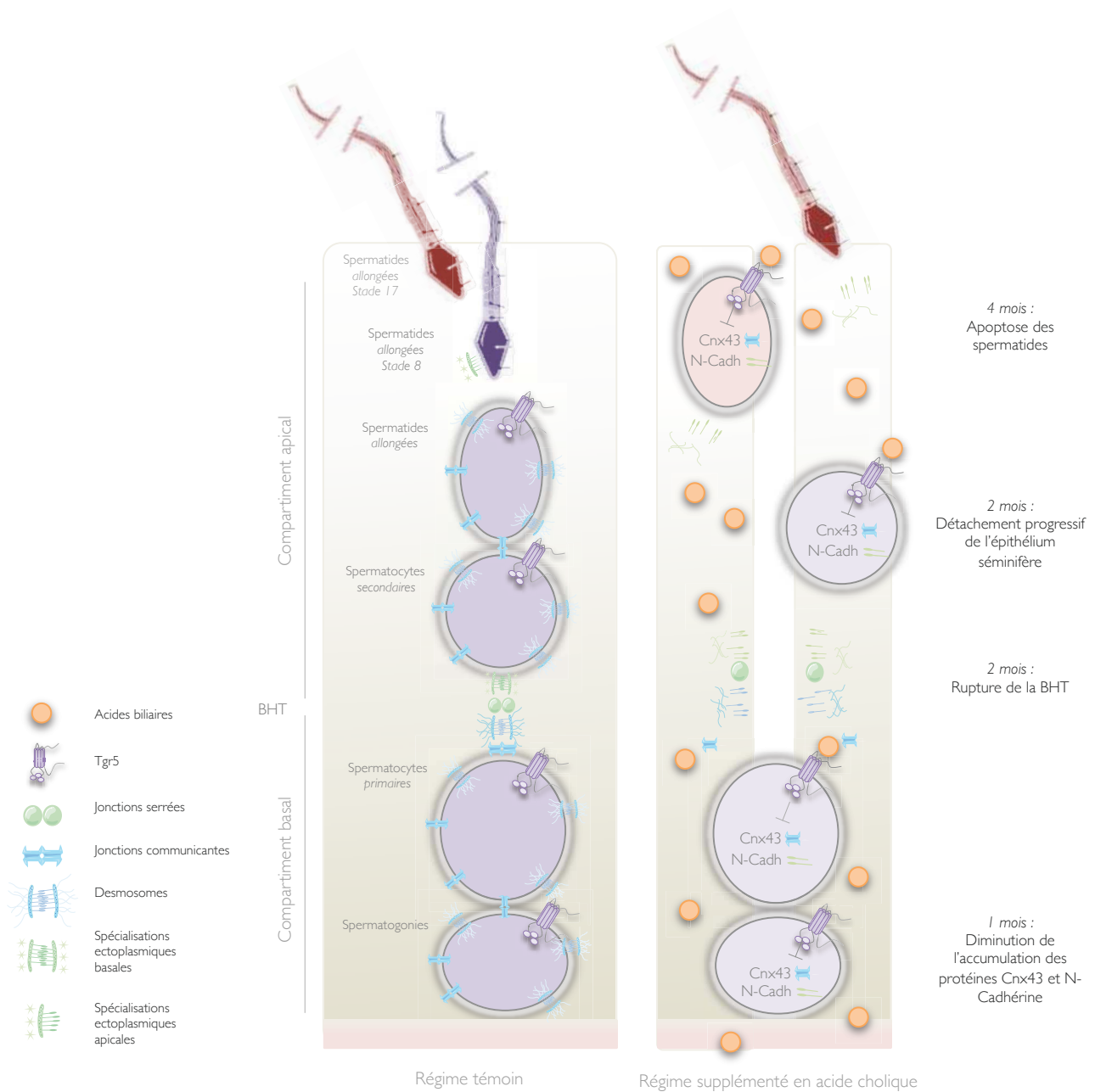


Figure 32. Modèle résumant les niveaux d'atteintes histologiques et moléculaires de l'épithélium séminifère en réponse à des concentrations supra-physiologiques d'acides biliaires.

Cnx43, Connexine43 ; N-Cadh, N-Cadhérine ; BHT, barrière hémato-testiculaire

Discussion et perspectives, Article I

Les objectifs de ces travaux étaient d'identifier et de caractériser l'impact de concentrations supra-physiologiques d'acides biliaires sur la physiologie testiculaire et le maintien des fonctions de reproduction à l'âge adulte.

Nous montrons que des souris adultes nourries par un régime supplémenté en acide cholique présentent une augmentation des concentrations d'acides biliaires à la fois plasmatiques et intra-testiculaires corrélées à une hypofertilité avec 25% des mâles exposés devenant stériles. Cette dernière est associée à une altération de la fonction exocrine du testicule caractérisée par une diminution de la production de spermatozoïdes consécutive à plusieurs atteintes de la spermatogenèse. 1 - un détachement de l'épithélium séminifère associé à une rupture de la barrière hémato-testiculaire résultant de la diminution de l'accumulation des protéines de jonction Connexine-43 et N-Cadhérine ; 2 - une apoptose des cellules germinales spécifiquement au stade de spermatide. Le rôle majeur de Tgr5 dans ce phénotype a pu être établi par l'utilisation de souris invalidées pour Tgr5 (Figure 32).

Ces travaux dressent le constat de l'impact majeur de l'hyperactivation par les acides biliaires de la signalisation Tgr5 vis-à-vis du maintien des fonctions de reproduction.

1. Phénotype systémique : agit-il en synergie avec Tgr5 ?

Notre protocole de traitement par un régime enrichi en acide cholique (0,5% CA) est un modèle bien décrit dans la littérature. On sait que chez la souris celui-ci se traduit par un phénotype multi-composantes en adéquation avec les rôles connus des acides biliaires. Notre modèle reproduit ainsi la perte de poids et la stéatose hépatique attendue. Par ailleurs, nous avons mis en évidence une diminution des transcrits hépatiques d'*Igf1* et des concentrations de testostérone plasmatiques altérées. Les conclusions de notre étude montrent clairement que ces effets ne sont pas suffisants pour expliquer l'infertilité induite en condition cholestatique puisque ces derniers restent présents chez les animaux *Tgr5*^{-/-} dont la fertilité et la physiologie testiculaire est préservée en réponse au traitement.

Est-ce que toutefois ces facteurs systémiques participent chez la souris sauvage à créer un contexte favorable à l'action délétère de Tgr5 ?

- L'une des expériences qui pourrait en partie répondre à la question serait de considérer chez la souris les conséquences d'un traitement par un agoniste synthétique spécifique de Tgr5 (INT-777). Calqué sur les critères de la présente étude, ce protocole permettrait : 1) de s'affranchir *in vivo* de la composante détergente liée à l'accumulation toxique d'acides biliaires (fragilité membranaire, atteinte mitochondriale) et ; 2) d'écarter l'action délétère attribuée à l'action de Fxrα (stéatose, androgènes plasmatiques ?).

2. Tgr5 responsable : action systémique ou locale ?

Notre modèle expérimental a permis de montrer, grâce à l'utilisation du modèle *Tgr5*^{-/-}, que les effets des acides biliaires sur la physiologie testiculaire sont médiés par l'action de Tgr5.

Plusieurs arguments suggèrent que l'hyperactivation de Tgr5 puisse être délétère au sein même de la lignée germinale : 1) Tgr5 est exprimé dans les cellules germinales ; 2) les acides biliaires sont présents et accumulés dans le testicule suite au régime ; 3) l'atteinte de la fertilité est proportionnelle à la présence de DCA testiculaire (ligand préférentiel de Tgr5) ; 4) il est possible grâce à un ligand spécifique de Tgr5 de reproduire sur une lignée isolée de cellules germinale (GC1spg) les effets moléculaires observés *in vivo* (*Tbx2*, *Cnx43*/*Cnx43*).

Toutefois nous ne pouvons exclure formellement la contribution systémique de Tgr5 pour l'altération de la physiologie testiculaire.

- La génération de souris invalidées spécifiquement pour Tgr5 dans la lignée germinale (croisement souris Prp-Cre x Tgr5 floxées) est en cours et permettra de répondre de manière définitive à cette question.

3. Mais où est Tgr5 ?

Les travaux de Vassileva ont permis de mettre en évidence la présence des transcrits *Tgr5* dans des extraits de testicule total de souris C57Bl6 adultes (Vassileva et al., 2006). L'un des objectifs premiers des travaux de thèse présentés dans ce manuscrit était de préciser sa localisation chez la souris adulte de même souche.

Nos données montrent, par plusieurs approches, que les transcrit *Tgr5* se trouvent majoritairement accumulés dans la lignée germinale. Ces conclusions sont appuyées par des données communiquées par le Dr. NEF (Paris, France ; communication personnelle) ; une approche transcriptomique menée à partir de tri cellulaire exclue la présence de *Tgr5* dans la lignée somatique murine.

La question de la localisation protéique de Tgr5 demeure cependant en suspens du fait du manque de spécificité des anticorps aujourd'hui accessibles. Il reste par ailleurs à déterminer les stades de différenciation de la lignée germinale où Tgr5 (transcrit et/ou protéine) est retrouvé. Dans ce contexte, il nous faudra :

- envisager la génération d'un nouvel anticorps Tgr5,
- développer un modèle murin transgénique porteur d'une construction GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle du promoteur du gène *Tgr5*.

4. Tgr5 et acides biliaire : mémoire de l'impact ?

La question de la localisation de Tgr5 est importante afin de mieux comprendre les mécanismes l'impliquant dans le phénotype testiculaire que nous avons décrit.

Si Tgr5 est présent dans les stades avancés de la spermatogenèse, ne pourrait-il pas être directement impliqué dans l'apoptose des spermatides ? A l'inverse, l'ensemble des événements (détachement épithélial, apoptose spermatide) est-il la résultante d'une dérégulation de la signalisation Tgr5 restreinte aux stades de différenciation précoces de la lignée germinale ; celle-ci pourrait alors se répercuter sur les différentes phases du processus de différenciation de cette même cellule indépendamment d'une nouvelle stimulation de Tgr5.

A la question de la localisation de Tgr5 s'ajoute celle de la biodisponibilité des acides biliaires vis-à-vis des différents types cellulaires du testicule. Chez des animaux témoins, l'injection d'un acide biliaire de synthèse fluorescent se traduit par un signal testiculaire interstitiel et pré-BHT. Les acides biliaires ne semblent donc pas capables d'atteindre le compartiment adluminal du tube séminifère en condition physiologique. Ceci appuie l'hypothèse d'une altération de la signalisation Tgr5 dès les stades précoces de la lignée germinale (spermatogonies-spermatocytes I). Lorsqu'à 4 mois de traitement la BHT est altérée le scénario est différent et les acides biliaires sont capables d'entrer au contact des cellules germinales post-BHT. La question des conséquences d'une telle distribution est alors à considérer.

Est-ce que les acides biliaires sont en mesure d'élargir l'impact sur la lignée germinale (apoptose des spermatides...) ? Est-ce qu'au contraire ces derniers, dilués dans le testicule total, ne se retrouvent plus en concentrations suffisantes pour avoir un quelconque effet ? Est-ce qu'alors le phénotype est voué à ne pas évoluer voire à s'essouffler ? Ou est-ce que le « mal est fait » et que les spermatogonies, cellules souches de la lignée germinale (SSCs), par un phénomène de « mémoire » de l'impact initial demeureront affectées sur le long terme indépendamment de la présence d'acides biliaires ? Pour répondre à l'ensemble de cette problématique nous proposons :

- De transplanter les spermatogonies d'une souris donneuse exposée aux acides biliaires durant 15 jours (premières atteintes moléculaires : *Tbx2*) dans le testicule d'une souris receveuse vidé de son contenu germinale suite à l'injection de busulfan (Brinster and Zimmermann, 1994). La qualité de la spermatogenèse issue des spermatogonies exposées sera évaluée selon les cinétiques et les critères pré-établis par notre modèle actuel, et ce indépendamment d'une nouvelle exposition aux acides biliaires.
- Cette expérience est dessinée sur l'hypothèse d'une action germinale de Tgr5. Elle exclue l'éventualité d'une « mémoire » systémique. Il sera donc important de compléter cette expérience par un protocole d'exposition transitoire des souris aux acides biliaires. Nous en

analyserons les conséquences sur la spermatogenèse au moins après un cycle de gamétogenèse plus tard.

La question de la réversibilité du phénotype est justifiée par le fait que certains modèles expérimentaux de perturbations des interactions cellulaires de l'épithélium séminifère sont définitifs (modèle Cadmium ou peptides pan-connexines) (Lee et al., 2009). De plus, il est aujourd'hui bien décrit que certaines expositions environnementales (perturbateurs endocriniens) ont des répercussions sur la fertilité de l'individu au long terme. Ces mécanismes mettent en jeu des mécanismes épigénétiques (méthylation de l'ADN essentiellement) que l'on sait pouvoir être affectés en réponse à la stimulation de Tgr5 (dérégulation de l'expression de *Dnmt3b*, voir Article II).

Il serait dans ce contexte intéressant de connaître le statut épigénétique des spermatogonies en réponse à un traitement par les acides biliaires. Portent-elles une empreinte altérant définitivement l'expression d'un acteur nécessaire au bon déroulement de la spermatogenèse ? Pour cela nous nous proposons :

- d'extraire la population souche de spermatogonies de souris témoins ou exposées aux acides biliaires grâce à une méthodologie de tri magnétique (Goharbaksh et al., 2013).
- de réaliser une analyse transcriptomique comparant les profils d'expression génique entre ces deux populations cellulaires.
- Une stratégie de séquençage des régions génomiques méthylées (meDIP-séq) complétera cette approche et permettra d'identifier des gènes dont l'empreinte de méthylation est altérée en réponse aux acides biliaires.

Pouvoir apporter des éléments de réponse à cette question est primordial lorsque l'on considère la physiopathologie humaine. *Est-ce que restaurer chez un patient cholestatique les concentrations d'acides biliaires sera suffisant à restaurer sa fertilité ? Sur quel critère pourrait-on alors évaluer la réversibilité de l'atteinte ? La restauration du nombre de spermatozoïdes suffirait-elle à s'assurer de l'intégrité de leur bagage génétique transmis à la descendance ?*

5. Fxr α et foie : l'hypo-androgénie là où on ne l'attendait pas !

Des travaux précédents ont permis de mettre en évidence la présence de Fxr α au niveau de l'espace interstitiel où son activation par un ligand synthétique conduit, à court terme, à la répression de la stéroïdogénèse et à une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone (Volle et al., 2007).

Chez la souris adulte nourrie par un régime supplémenté en acide cholique, nos analyses ne montrent aucun signe révélateur d'un défaut de production d'androgènes. En effet, nous n'avons pu

identifier : 1) aucune diminution des concentrations intra-testiculaires de testostérone ; 2) aucune modulation de la signalisation androgéno-dépendante au niveau testiculaire.

Pour autant, des données complémentaires montrent qu'il existe dans le même temps une répression de l'expression des enzymes de la stéroïdogenèse (*Star*, *Cyp17a1*, *Cyp11a1*). Ceci suggère l'intervention des signalisations Fxr α en réponse aux acides biliaires. Elles ne seraient toutefois pas, ou peu, impliquées dans le phénotype testiculaire puisque nous avons démontré que seule la signalisation Tgr5 en est responsable. Ces observations posent alors plusieurs questions :

Comment expliquer que la diminution des transcrits de la stéroïdogenèse ne se traduise pas par une diminution des concentrations d'androgènes testiculaires ?

L'une des hypothèses serait que la diminution des transcrits de ces enzymes ne suffise pas à affecter leur activité. Ceci apparaît être le cas puisque nos données montrent que les concentrations intra-testiculaire de plusieurs intermédiaires métaboliques de la stéroïdogenèse, produits directs de ces mêmes enzymes (androstènedione, androstérone), ne sont pas affectées suite au traitement.

Comment alors expliquer la diminution des concentrations plasmatiques d'androgènes observée dans notre modèle ?

Le maintien des concentrations plasmatiques d'androgènes est le résultat d'une balance entre leur synthèse et leur catabolisme. L'inactivation et l'élimination des androgènes sont essentiellement prises en charge par le foie. Ces procédés enzymatiques sont communs à plusieurs molécules dont les acides biliaires ; ces derniers sont d'ailleurs capables, *via* Fxr α , d'induire l'expression de plusieurs enzymes cataboliques telles *Ugt2b4* ou *Cyp3a11*.

De manière cohérente avec la littérature, l'accumulation hépatique de ces transcrits est augmentée dans notre modèle, et ce dès 15 jours de traitement par un régime 0,5% CA. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que leurs inductions puissent interférer avec l'homéostasie des stéroïdes circulants et être à l'origine d'une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone telles que nous l'observons.

- Mesurer les concentrations plasmatiques et urinaires de testostérone conjuguées (sulfate ou glucuronide) (Bowers and Sanaullah, 1996) pourrait contribuer à valider cette hypothèse.

6. De la perte d'interaction au développement tumoral ?

D'après nos travaux, Tgr5 apparaît en conditions pathologiques comme un régulateur majeur des jonctions intercellulaires structurant l'épithélium séminifère. Cette action est en partie médiée par l'induction de l'oncogène *Tbx2*, répresseur connu de l'expression de la *Connexine-43*.

La perte d'adhésion cellulaire se traduit classiquement par la mise en place d'un processus

d'*anoïkis*. Dans ce sens, nous nous attendions à ce que les cellules germinales détachées soient inertes, évacuées dans le fluide séminifère, et éliminées. Cependant, nos observations montrent clairement que celles-ci sont capables de s'accumuler au centre de la lumière. De plus, des analyses complémentaires montrent que ces cellules n'engagent pas un processus apoptotique, mais qu'au contraire certaines d'entre elles continuent à proliférer (données non publiées) ; deux propriétés attribuées aux cellules cancéreuses.

Nous posons donc l'hypothèse qu'un apport exogène d'acides biliaires, en plus d'entraîner une hypofertilité, pourrait participer à au développement et/ou à l'évolution de tumeurs germinales.

Plusieurs éléments bibliographiques soutiennent cette hypothèse : 1) Chez l'homme, il existe une corrélation entre l'infertilité et la carcinogenèse testiculaire (Hotaling and Walsh, 2009). Dans ce sens, un régime supplémenté en acides biliaires conduit à une hypofertilité avec 25% des mâles exposés devenant stériles ; 2) Chez l'homme, la réduction des niveaux d'accumulation testiculaire des transcrits *CNX43* est associée au degré d'atteinte de la spermatogenèse (Matsuo et al., 2007) et ; 3) certaines études suggèrent que la perte d'expression de la *CNX43* pourrait être l'un des événements initiateur du développement de tumeurs testiculaires (Brehm et al., 2002 ; Segretain et al., 2003) ; 4) Les acides biliaires et la signalisation TGR5 sont impliqués dans l'évolution cancéreuse de plusieurs tissus notamment gastro-intestinaux (Hong et al., 2010 ; Lagergren and Mattsson, 2011).

Une analyse rétrospective de données de transcriptomes, rendues disponibles par notre collaboration avec l'équipe du Dr. Jegou (Rennes, France), a permis de révéler des niveaux détectables d'accumulation de transcrits *TGR5* dans des biopsies testiculaires de tissu sain. D'autre part, des analyses moléculaires complémentaires montrent que *TGR5* est exprimé 1- dans des biopsies testiculaires de patients stériles (infertilités d'origine sécrétoires et excrétoires) (Collaboration Dr. Pointis, Nice, France) et 2- dans des biopsies de tumeurs testiculaires humaines de type séminome, carcinome embryonnaire ou tératome (collaboration Dr. Rajpert-De Meyts, Copenhague, Danemark).

Ces données sont appuyées par la détection de transcrits *TGR5* dans les lignées cellulaires cancéreuses germinales humaines de type séminomateuses (TCam2) ou issues de carcinome embryonnaire (NTera2). Dans ce contexte nous proposons :

- *in vitro*, d'étudier le potentiel oncogénique d'une lignée humaine de cellules germinales cancéreuses, TCam2 (lignée séminomateuse), en réponse à la modulation de la signalisation TGR5 (balance prolifération-apoptose ; agressivité des cellules).
- d'analyser *in vivo*, à partir d'un modèle de xénogreffe, le potentiel oncogénique de cellules TCam2 en réponse à la modulation de la voie TGR5.
- chez la souris, de déterminer le potentiel tumoral d'une exposition de longue durée à un régime riche en 0,5% CA.

Des données épidémiologiques plaident pour l'origine fœtale du cancer testiculaire en réponse à l'exposition à des facteurs environnementaux tels que les perturbateurs endocriniens. Nous avons identifié *Tgr5* dans les cellules germinales primordiales d'embryons de souris (collaboration P.Arnaud, GReD, Clermont-Ferrand, France).

- Seul ou en synergie avec d'autres facteurs, nous testerons le rôle oncogénique de dérégulations embryonnaires de la voie Tgr5 chez la souris.

Ces travaux pourraient alors contribuer à l'élaboration d'un modèle murin de cancer testiculaire, encore inexistant à ce jour.

Article II

Paternal exposure to bile acid induces transgenerational abnormalities of progenies.

Baptissart M, Martinot E, de Haze A, Arnaud P, Baron S, Thibault-Carpentier C, Schoonjans K, Caira F, Volle DH,

En préparation

Paternal exposure to bile acid induces transgenerational abnormalities of progenies.

Marine BAPTISSART^{1,2,3}, Emmanuelle MARTINOT^{1,2,3}, Angélique De HAZE^{1,2,3}, Philippe ARNAUD^{1,2,3}, Silvère BARON^{1,2,3}, Christelle THIBAUT-CARPENTIER⁴, Kristina SCHOONJANS⁵, Françoise CAIRA^{1,2,3} and David H. VOLLE^{1,2,3*}

¹Inserm U1103, Génétique Reproduction et Développement (GReD), BP80026, 63170 Aubière, France

²Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, 63170 Aubière, France

³CNRS, UMR 6293, GReD, 63170 Aubière, France

⁴IGBMC - CNRS UMR 7104 - Inserm U 964, 1 BP 10142, 67404 Illkirch CEDEX, France

⁵Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Abbreviated title: Transgenerational impact of Bile acid exposure.

Key terms: Bile acid, germ cell differentiation, epigenetic.

Corresponding authors to whom reprint requests should be addressed: Dr. DH VOLLE, *PhD*

“Génétique Reproduction et Développement”,

Inserm U1103, Unité Mixte de Recherche CNRS 6293, Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France.

e-mail: david.volle@inserm.fr

Disclosure Statement: The authors have nothing to disclose

Abstract

Next to their ancestral roles in digestion and fat solubilization, bile acids (BAs) have been described as signaling molecules. These signaling pathways involve activation of the nuclear receptor Farnesol-X-Receptor (FXR α) or of the G-protein-coupled Bile Acid Receptor-1 (GPBAR-1 or TGR5). BAs are involved in regulation of many physiological functions. BAs were demonstrated to impact male fertility. This was associated with abnormalities of germ cell lineage due to activation of testicular TGR5. Based on that, we wondered what could be the impact of germ cell DNA integrity and potential consequences for progenies. BA-exposure of male mice to BA-diet leads to increase of perinatal lethality of pups (F1-CA). The surviving progenies present altered postnatal growth and glucose metabolism. Adult F1-CA males transmitted deleterious phenotypes (lethality, altered growth and glucose metabolism) to the following generation (F2-BA). We demonstrate that these effects seemed to be mediated by BA-TGR5 signaling pathway and were associated to alterations of epigenetic processes in the testis. Our data point out for the first time that altered BA metabolism in males might have some

transgenerational consequences which could participate to expand of metabolic diseases.

Introduction

Several animal models using various contaminants, nutrition, and lifestyle-related conditions suggest a paternal influence on the offspring's future health [1]. Males contribute to the future generation through the information transmitted *via* sperm cells [2]. Recent studies have described numerous environmentally-induced disruptions of the epigenome (epimutations) in mammals [3]. While some of these appear to be corrected by normal germline-specific epigenetic reprogramming and are therefore not transmitted, others are not corrected and are disseminated over multiple subsequent generations [4]. Even if the role for histone modifications, DNA methylation [5], histone modifications [6] and/or RNA [7] has been proposed, the mechanism(s) responsible for inheritance of environmentally induced phenotypes remains largely unknown.

Recently, we have demonstrated that bile acids alter testis physiology on endocrine and exocrine functions *via* Farnesol-X-Receptor (FXR α) or G-protein-coupled Bile

Acid Receptor-1 (GPBAR-1 or TGR5) respectively [8], [9]. *Tgr5* is expressed in germ cells and mediates BA signaling within this cell type. One of the main impacts of TGR5 is the induction germ cell apoptosis was observed at the spermatid step. However the exact role of BA with germ cell lineage has not been established so far. We thus wonder whether BA-diet could impact alter DNA integrity of germ cell. For that purpose, we exposed adult male mice to dietary BA supplementation. We show that mice fed a diet supplemented with cholic acid (CA) have altered condensation of germ cell nucleus during spermatogenesis. This was associated with a higher perinatal mortality of pups originating from F0 exposed to BA. In addition, surviving F1 pups show abnormal post-natal development with lower weight-gain and hyperglycemia. More surprisingly, this F1-CA progeny which has never been exposed to BA-diet show altered fertility and transmit the some of the abnormalities to the F2 generation associated with perinatal mortality. In conclusion, these data highlight that the BA signaling pathway plays a critical role in male germ cell physiology.

Materials and Methods

Ethics Statement. This study was conducted in accordance with the current regulations and standards approved by the Animal Care Committee (CEMEA Auvergne; CE 07-12).

Animals. C57Bl/6J were purchased from the Charles River Laboratories^(c) (L'Arbresle, France), and the *Tgr5*^{-/-} mice used have been previously described [10]. The mice used in this study were maintained on a C57BL/6J background and housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. Nine-week-old mice were exposed to the D04 diet (Control) or the D04 diet, supplemented with 0.5% cholic acid (CA-diet) (SAFE, Augy, France) for 3.5 months.

Electron microscopy. Electron microscopy was performed as previously described[11]. Briefly, samples were fixed in 2% glutaraldehyde-0.5% paraformaldehyde in cacodylate buffer at 4 C for 24 h. Fixed testis were subsequently postfixed for 1.5 h in buffered osmium tetroxide at 4 C and embedded in Epon Araldite (Delta Microscopies, Ayguesvives, France). Ultrathin sections was stained with uranyl acetate and

observed with a Hitachi H-7650 transmission electron microscope (Hitachi Elexience, Verrières-le-Buisson, France).

Glucose & insulin measurements. Colorimetric assays were performed as recommended by manufacturer (Glucose RTU, 61269, Biomerieux SA, France and Insulin EIA kit A05105, Bertin Pharma, France).

Glucose Tolerance Test. Mice were fasted overnight. Then they were challenged with a glucose 2 g/kg) by IP. At regular time points, blood glucose concentrations were measured, and blood samples were collected to determine insulin levels.

Insulin Tolerance Test. Mice were fasted 4 hours, and then they were challenged with insulin (1mU/g) by IP. At regular time points, blood glucose concentrations were measured, and blood samples were collected to determine insulin levels.

DNA methylation analysis. Bisulphite treatments were performed by using the EZ DNA methylation-Gold kit (Zymo D5005) according manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed for 40 cycles in 20 µl containing 50 pmol of each primer, 0.2 mM each dNTP, 1.25 U HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen) in the recommended buffer and 2,5 mM MgCl₂. The methylation pattern of the native DNA was assessed by a TaqI-based (TCGA) restriction digestion of the purified PCR products, according standard procedures, followed by migration on a 2% agarose gel. Briefly, following bisulphite treatment, there is appearance/retention or loss of TaqI restriction sites in the region of interest, depending on whether the cytosine residue was originally methylated or not. Thus, digestion indicates the 'methylation pattern' of the population of molecules in PCR products. Undigested PCR product suggests the absence of methylation (at TaqI site(s)) in the native sequence, whereas complete digestion indicates a high degree of methylation (at TaqI site(s)) in the native sequence.

Microarrays. Microarray analysis was performed on 3 pools of 3 mice per diet-groups. mRNA samples were analyzed using Agilent Gene Expression Microarray, 8x60K (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) using statistical method FCROS "Fold Change Rank Ordering Statistics" [12]. With this method, a statistical (f value) is

associated with the largest ratio values for each gene between the experimental groups. This statistic varies between 0 and 1. The more genes are overexpressed, the higher the f value is close to 1. Statistics are used to identify differentially expressed genes according to a defined error rate. For example, to identify differentially expressed with an error rate of 5% genes, select the genes for which the f value is <0.025 and >0.975 .

Real-Time RT-PCR. RNA from testis samples was isolated using Nucleospin RNA L (Macherey-nagel, Hoerd, France). cDNA was synthesized from total RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnière Les Bains, France). The real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. The sequences of primers are reported in supplemental data as Suppl. Table 1. Standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Western blot. Proteins were extracted from NP40, 1X protease inhibitors (Roche tissues

using lysis buffer (0.4 M NaCl, 20 mM Hepes, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.1% Roche Diagnostics, Meylan, France)). Antibodies were used in TBS, 0.1% tween and 10% milk. Antibodies used are given in supplemental information (Suppl. Table 2).

Results

BA-exposure of F0 results in post-natal abnormalities of F1 pups. In order to better define the impact of BA exposure on testicular germ cells, adult male mice were fed a diet supplemented with 0.5% of cholic acid (CA) as previously. As expected BA-exposed males (F0-CA 0.5%) showed altered fertility. Analyses of litters during pregnancy demonstrate a decrease of the number of fecundation (16%, **Fig. 1A**) and a 6-fold increase of pups dead (**Fig. 1B**) during pregnancy. In addition, the 46% of progenies borne from BA-exposed fathers died in the first 15 days of life (**Fig. 1C**). No difference was observed between sexes regarding sensitivity (**Fig. 1D**). The overall percentage of lethality (*in utero* plus neonatal) is around 62% in CA-exposed mice (**Fig. 1E**). Note that for all these parameters no effect was observed with the 0.2% CA-diet (**Suppl. 1A, 1B & 1C**).

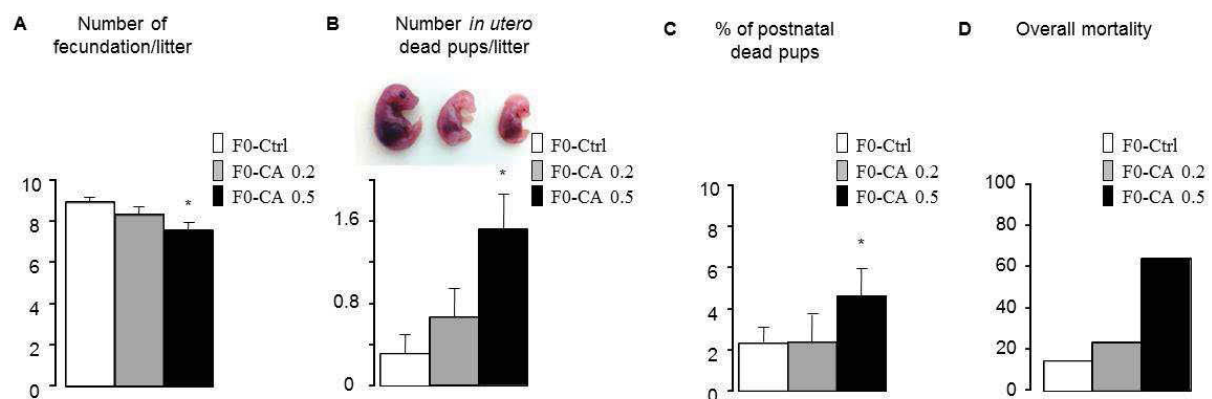


Figure 1. BA exposure increases progeny lethality. (A) Number of fecundation in F0 males fed control (ctrl), 0.2%CA or 0.5%CA diets. (B) Number of dead pups observed at E.16.5 in pups originated from F0 males fed control (ctrl), 0.2%CA or 0.5%CA diets. (C) Percentage of postnatal dead pups originated from F0 males fed control (ctrl), 0.2%CA or 0.5%CA diets. (D) Overall percentage of dead pups originated from F0 males fed control (ctrl), 0.2%CA or 0.5%CA diets. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$ vs control diet group.

BA-exposure alters neonatal male mice growth. We next analyzed the phenotype of surviving mice. Results showed that F1 mice, both males and females, have similar body

weight at birth between groups and up to 8-days old (**Fig. 2A**). Then since 15-days after birth, F1-CA progenies had lower body weight compared to F1-Control (F1-Ctrl) mice (**Fig.**

2A). Interestingly, this difference in body weight was associated with a hyperglycemia in F1-CA mice visualized after 5 hours of fasting (**Fig. 2B**). At the molecular level, this altered glucose metabolism was supported by enhanced expression of *Phosphoenol pyruvate*

carboxykinase (Pepck) and of *Glucose-6-Phosphatase (Fig. 2C)*. Moreover, the F1-CA pups had higher insulin plasma levels compared to F1-Ctrl (**Fig. 2D**). Note that no sexual dimorphism was observed for these parameters (**data not shown**).

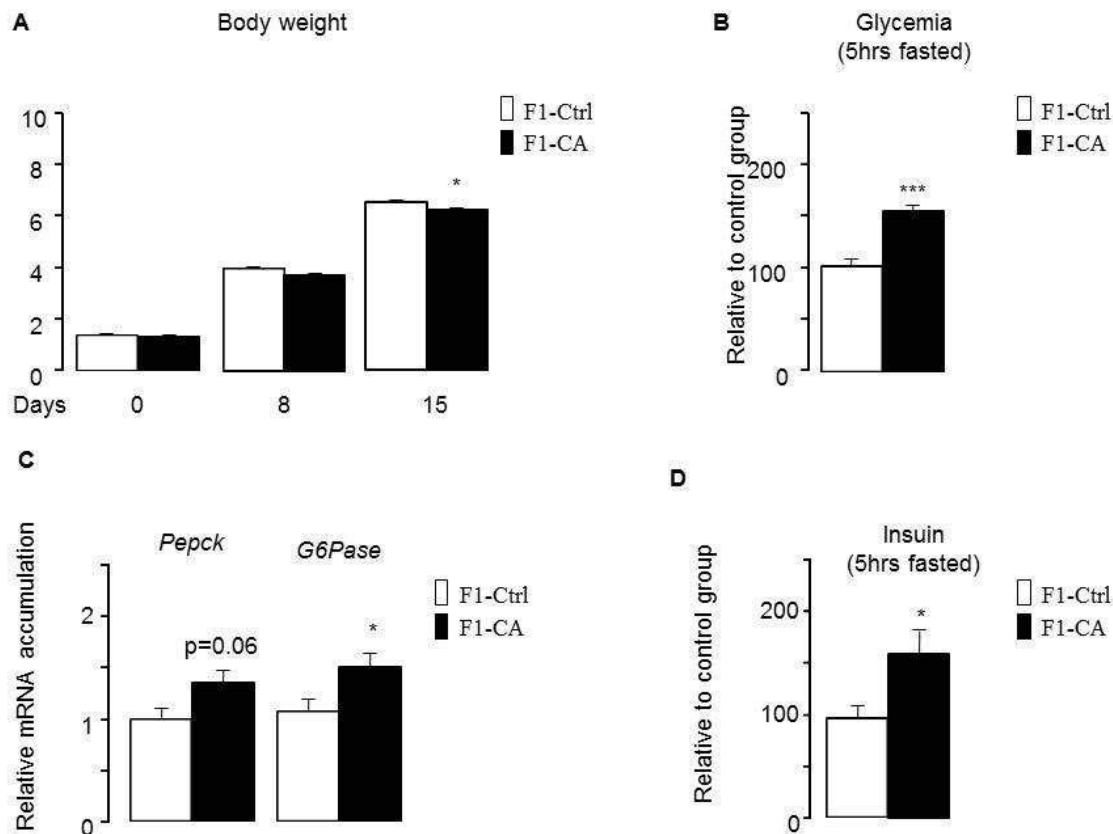


Figure 2. BA exposure alters neonatal glucose metabolism. (A) Body weight of F1 pups, originated from F0 males fed control (F1-Ctrl) or 0.5%CA diet (F1-CA), at birth (0, 8 days and 15 days old). (B) Relative glucose levels 15 days old F1-Ctrl and F1-CA pups. (C) Liver mRNA accumulation of *Pepck* and *G6Pase* normalized to β -actin in F1-Ctrl and F1-CA pups at 15 days old. (D) Relative insulin levels in 15 days old F1-Ctrl and F1-CA pups. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$ vs control diet group.

Glucose homeostasis is altered in adult F1-CA male. The effect of CA-diet on body weight was maintained up to adulthood with lower body weight in F1-CA compared to F1-Ctrl (24-weeks old) (**Fig. 3A**). Conversely to 15-days old mice, since 5-weeks old, mice did not show altered glycemia after fasting, neither in response to glucose or insulin tolerance tests (**Suppl. 1B**). In adult mice glycemia was not altered after short (5hrs) or long (16hrs) term fasting conditions (**Fig. 3B**). No significant difference was observed in response to glucose during glucose tolerance test (GTT) experiments (**Fig. 3C**). However, a slight delay in glycemia restoration was observed as during

the restoring phase of glucose levels (red square, **Fig. 3C**). Surprisingly, F0-CA mice showed enhanced sensitivity to exogenous insulin was observed during ITT experiments (**Fig. 3E**). This suggests that downstream insulin signaling pathways were efficient in F1-CA mice. Strikingly, no significant effect on plasma insulin levels was observed (**Fig. 3F**). The discrepancy observed between ITT and IGTT could be the result of an altered production/secretion of insulin by F1-CA mice compared to F1-Ctrl in response to glucose during IGTT. ***This should be linked to alterations of pancreas functions in F1-CA mice.***

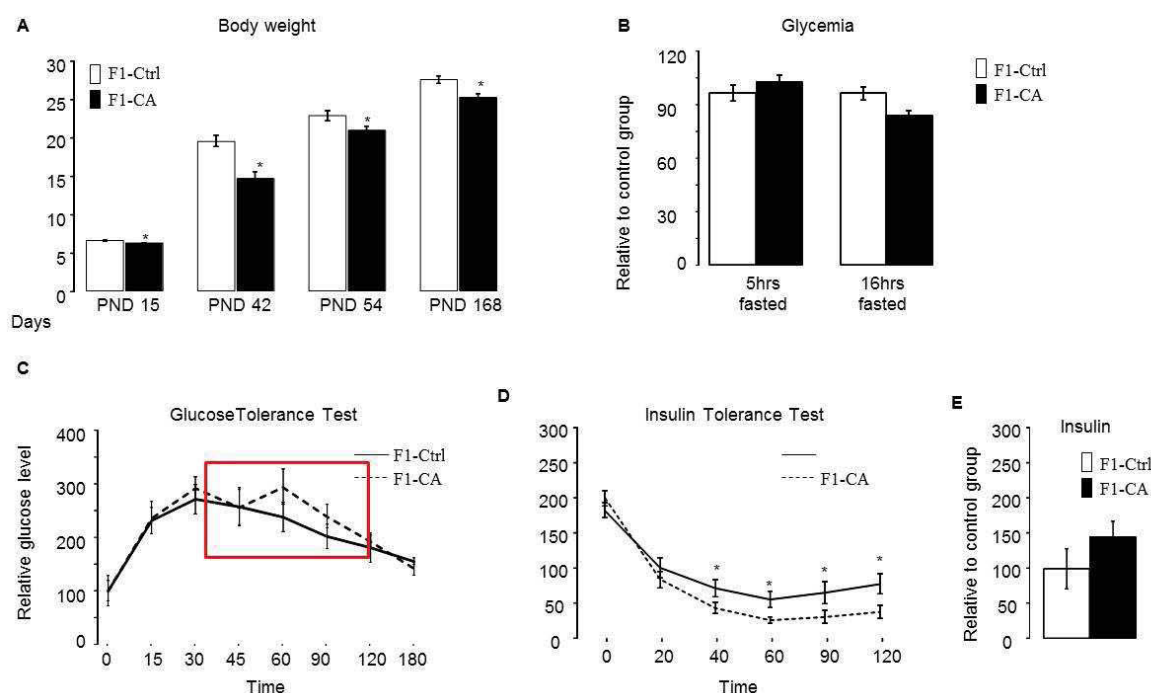


Figure 3. BA exposure alters glucose metabolism. (A) Body weight of F1 pups, originated from F0 males fed control (F1-Ctrl) or 0.5%CA diet (F1-CA), from birth to adulthood (168 days). (B) Relative glucose levels adult F1-Ctrl and F1-CA mice after 5 and 16 hours of fasting. (C) IGTT in adult F1-Ctrl and F1-CA mice. (D) ITT in adult F1-Ctrl and F1-CA mice. (E) Relative insulin levels in adult F1-Ctrl and F1-CA mice. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. $n=5-6$ per group. Statistical analysis: * $p<0.05$ vs control diet group.

TGR5 mediates generational effects of BA. It has been previously demonstrated that the deleterious BA impacts on testis are mediated by TGR5. The use of *Tgr5*^{-/-} males supported these results as F1-*Tgr5*^{-/-}-CA did not show altered viability compared to F1-*Tgr5*^{-/-}-C (Fig.

4A). In addition F1-*Tgr5*^{-/-}-BA had normal body weight gain in early postnatal life (Fig. 4B). Consistently, 15-days old F1-*Tgr5*^{-/-}-BA did not have altered glycemia (Fig. 4C). *The mice are now getting older to analyze glucose metabolism as well as sensitivity to insulin.*

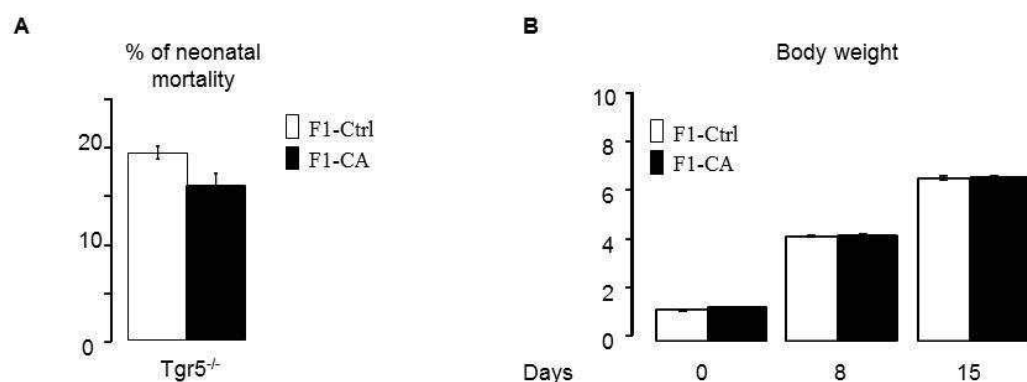


Figure 4. BA exposure effects are TGR5 independent glucose metabolism. (A) Percentage of postnatal dead pups originated from F0 *Tgr5*^{-/-} males fed control (ctrl) or 0.5%CA diets. (B) Body weight of F1 pups, originated from F0 *Tgr5*^{-/-} males fed control (F1-Ctrl) or 0.5%CA diet (F1-CA), at birth (0, 8 days and 15 days old). In all panels data are expressed as the means \pm SEM. $n=5-6$ per group. Statistical analysis: * $p<0.05$ vs control diet group.

F1-CA progenies have altered fertility. As we have previously demonstrated the impact of BA on testicular physiology, we studied it in F1-CA mice. Even though testicular

physiology needs to be studied, the number of spermatozoa produced was not affected in F2-CA compared to F1-Ctrl (Fig. 5A). However, fertility test showed that F2-CA had altered as

highlighted by the decreased number of pups per litter (Fig. 5B). Altogether, these data

suggest putative qualitative defect of F1-CA spermatozoa.

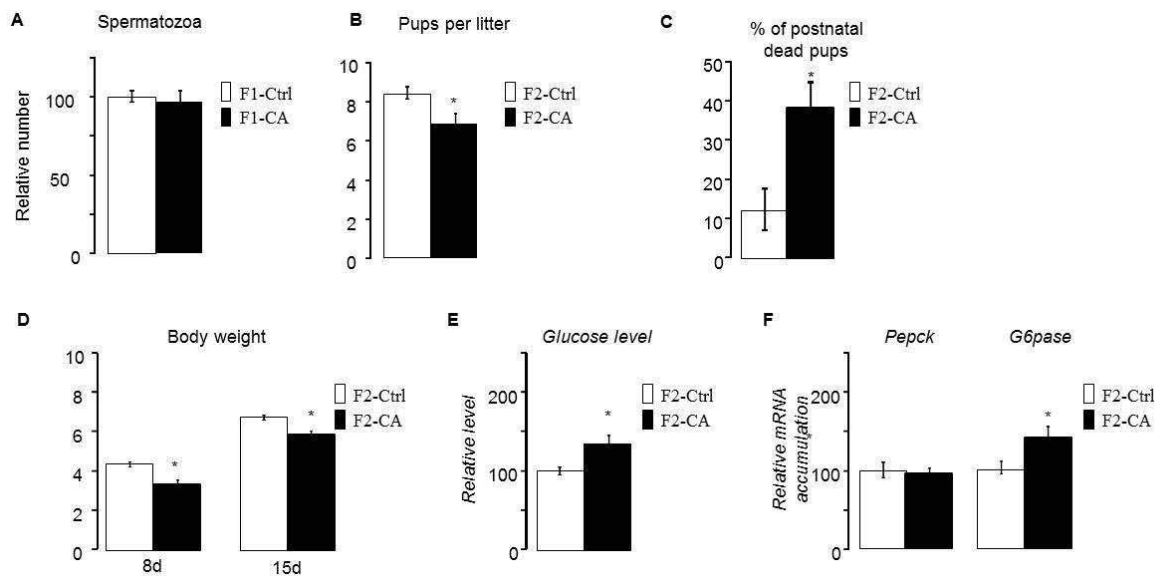


Figure 5. BA exposure of F0 males impacts F2 progenies. (A) Sperm count in the epididymis tail in adult F1-Ctrl and F1-CA mice. F1-Ctrl mice were arbitrarily fixed at 100%. (B) Each male was bred with 2 C57Bl6/J females to analyze their reproductive capacity with the number of pups per litter. (C) Percentage of postnatal dead F2 pups originated from F1-ctrl or F1-CA mice. (D) Body weight of F2 pups, originated from F1-Ctrl or F1-CA at 8 days and 15 days old. (E) Relative insulin levels in 15-days old F2-Ctrl and F2-CA mice. (F) Liver mRNA accumulation of *Pepck* and *G6pase* normalized to β -actin in F2-Ctrl and F2-CA pups at 15 days old. In panels B, C, D, E & F data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group. Statistical analysis: * p<0.05 vs control diet group.

F2 pups show postnatal developmental abnormalities. In the last years, exposure to multiple stresses has been demonstrated to induce multi-generational impacts. We thus wondered whether the impacts of BA-diet on F0 and then F1 progenies could be transmitted to a second generation. As in F1-CA, F2-CA progenies showed increased perinatal mortality compared to F2-Ctrl (Fig. 5C). Moreover, as in F1-CA, the surviving pups present a similar body weight to controls at birth; however from 8-days postnatal, F2-CA had lower body weight compared to F2-Ctrl (Fig. 5D). Interestingly, in the same time frame as in F1, the 15-days old F2-CA pups had hyperglycemia compared to F2-Ctrl (Fig. 5E). Consistent with F1 data, glycemia was correlated with the higher mRNA accumulation of *G6pase* mRNA in liver of F2-CA compared to F2-Ctrl (Fig. 5F). **BA-exposure alters DNA condensation of F0 germ cells.** Next to the impact of BA-diet on the decrease of spermatozoa production [9], it might impact germ cell DNA integrity leading to transgenerational impacts. In order to define the origin of this multi-generational phenotype,

we analyzed testis/germ cell physiology in F0-CA males and. First impact of BA-diet on germ cells was identified using electronic microscopy on testis from mice fed control or CA-diet (Fig. 6A). Data clearly show that germ cells from BA-exposed males have altered DNA condensation, which is a normal process during spermiogenesis. This step of spermatogenesis is characterized by the transition from histone to protamine. BA-diet did not affect mRNA accumulation of either transition protein (*Tnp1* & *Tnp2*) neither protamines (*Prm1* & *Prm2*) (Suppl. 2). No significant effect in global H3 and H4 levels were observed in F0-BA males compared to F0-C ones (Fig. 6B). Western blot analysis showed lower levels of H4-ac in testis of F0-BA compared to F0-C (Fig. 7B). Interestingly, H4acetylated level has been defined as preclude for histone-to-protamine transition. In addition, during spermiogenesis, DNA strand breaks in elongating spermatids lead to the formation of poly(ADP-ribose) by PAR polymerases (*i.e.*, PARP1 and PARP2). Present results showed lower levels of cleaved PARP-1 in F0-CA testis compared to F0-C group (Fig.

7B). This suggests PARP-1 could be hyperactivated. *We now need to confirm this*

through the analysis of PARylation levels.

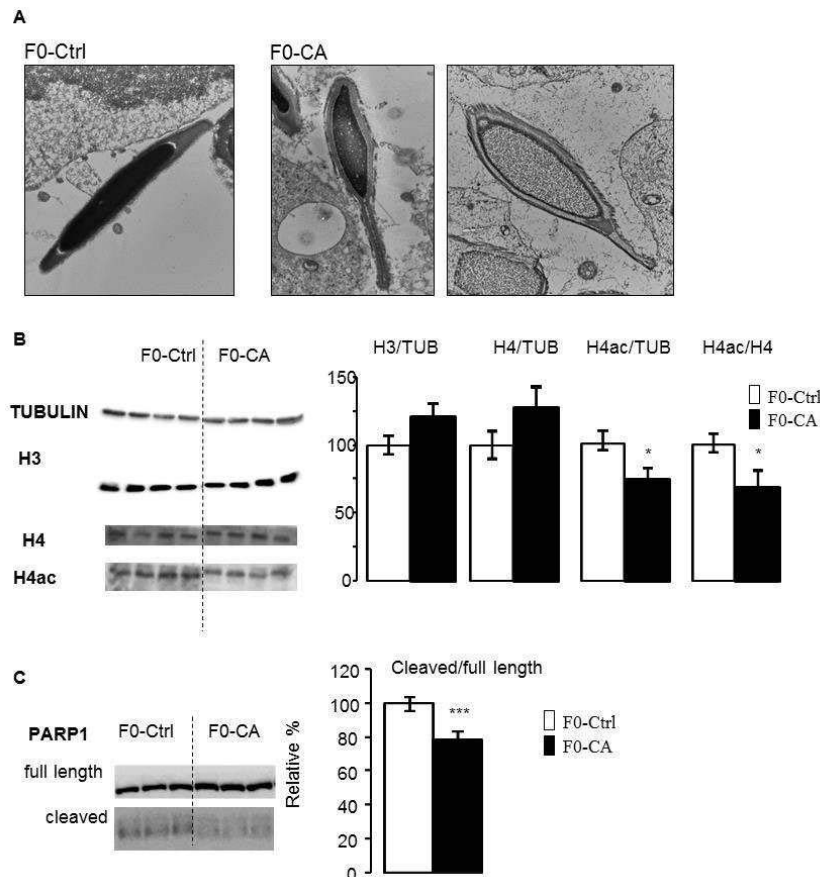


Figure 6. BA-diet alters germ cell DNA condensation. (A) Representative images of electronic microscopy of testis from F0-Ctrl and F0-CA mice. **(B)** Immunoblots of TUBULIN, H3, H4 and H4-ac on testicular protein extracts of F0-Ctrl and F0-CA mice (n=6-10 per group). Quantification of H3 and H4 protein accumulations compared to TUBULIN, and H4-ac compared to TUBULIN or H4. **(C)** Immunoblots of cleaved and uncleaved PARP-1 on testicular protein extracts of F0-Ctrl and F0-CA mice (n=6-10 per group). Quantification of cleaved PARP1 protein accumulations compared to TUBULIN, and H4-ac compared to TUBULIN or uncleaved PARP-1. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group. Statistical analysis: * $p < 0.05$ vs control diet group.

BA-exposure alters epigenetic processes in F0-CA testis. In order to define molecular pathways that could be involved in altered germ cell physiology leading to the multigenerational phenotype, we performed a gene candidate approach. Regarding histone modifications, the expression of histone methyltransferases *Ezh2*, *G9a*, and *Suv39h2* were not affected by BA- diet. In contrast, mRNA accumulation of *Suv39h1* was increased in F0-CA testis (**Fig. 7**). At the protein level no impact was observed on H3K27me3 level, whereas H3K4me2 was significantly increased in F0-BA testis (**Fig. 7A**). DNA methyltransferases *Dnmt1*, *Dnmt2*, *Dnmt3a*, and *Dnmt3L* were modified in response to BA-diet (**Fig. 7B**). In contrast, *Dnmt3b* was found to be increased in testis of F0-BA males compared to F0-ctrl group (**Fig. 7B**). In that

line mRNA accumulations of imprinted genes (*Mest*, *Rtl1*, *Gtl2* and *H19*) was not altered in F0-CA males compared to F0-Ctrl group (**Fig. 7B**). No effect was observed on *Piwi1* and *Piwi2* (**Fig. 7C**).

We have next performed a through-highput analysis. Microarray analysis showed that following BA-diet altered the expression numerous genes (**Suppl. 3A**). 24 genes were up-regulated and 43 genes were down-regulated in F0-BA compared to F0-C (**Suppl. 3A**). Among all these genes, only 6 were also deregulated in *Tgr5*^{-/-} males (**Suppl. 3B**), clearly suggesting that TGR5 plays major role in mediating the effects of BA on testis. Among them, imprinted gene *kcnqlot1* was decreased (**Suppl.3A**). This suggested that DNA methylation could have been altered at particular locus. Surprisingly, 25% of the BA

targets are long non coding RNA (Suppl. 3A). Gene and phenotype ontologies for BA-deregulated genes showed potential impact on

cell proliferation, inflammatory processes as well as stem cell maintenance, regulation of genetic imprinting (Suppl. 3C and 3D).

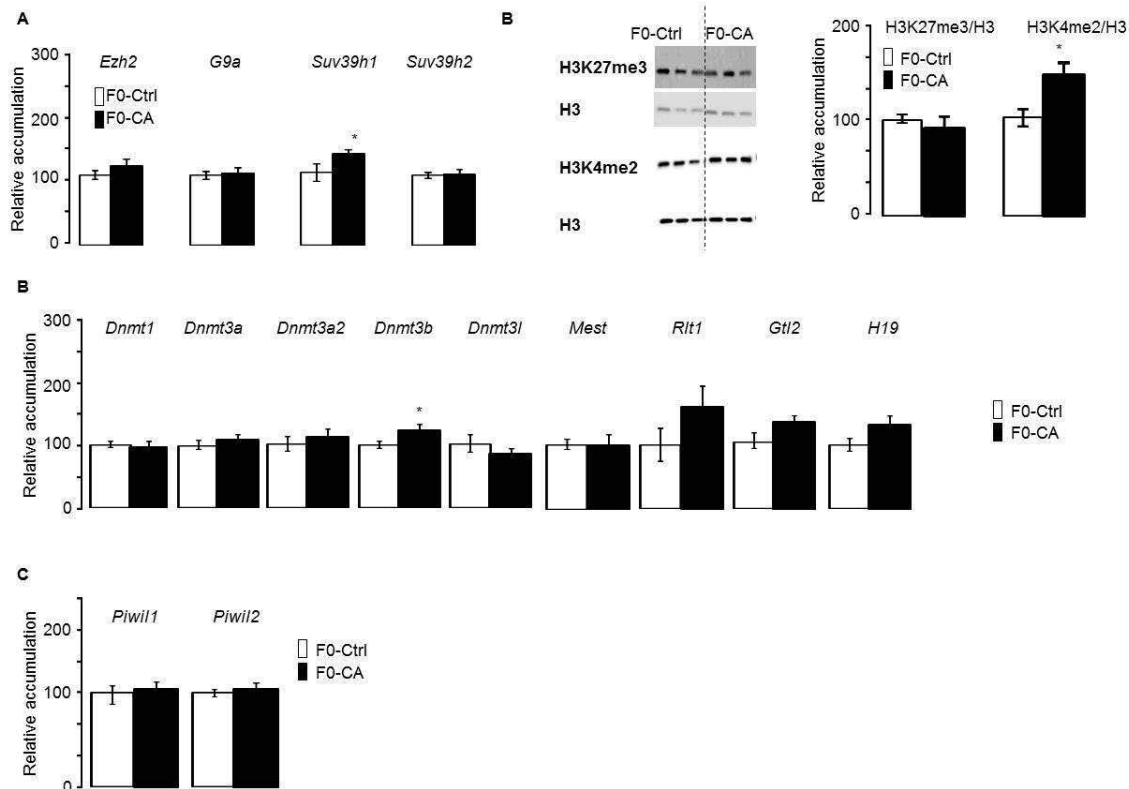


Figure 7. BA-diet alters germ cell DNA condensation. (A) Testicular mRNA accumulation of *Ezh2*, *G9a*, *Suv39h1* and *Suv39h2* normalized to β -actin in F0-Ctrl and F0-CA. (B) Immunoblots of H3K27me3, H3K4me2 and H3 on testicular protein extracts of F0-Ctrl and F0-CA mice (n=6-10 per group). Quantification of H3K27me3 and H3K4me2 protein accumulations compared to H3. (C) Testicular mRNA accumulation of *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3a2*, *Dnmt3b*, *Dnmt3l*, *Mest*, *Rtl1*, *Gtl2* and *H19* normalized to β -actin in F0-Ctrl and F0-CA. (D) Testicular mRNA accumulation of *Piwil1* and *Piwil2* normalized to β -actin in F0-Ctrl and F0-CA. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group. Statistical analysis: * p<0.05 vs control diet group.

Histone code is altered in F0-BA sperm. We next studied in spermatozoa some of the epigenetic factors known to be involved in generational transmission. Analyses of DNA methylation levels on specific DNA methylated Region (DMR) of imprinted genes such as *Kncqlot1*, *H19* and *Zac1* did not

shown differential methylation between groups (Suppl. 4). In spermatozoa, no difference was noted in levels of H4-ac between groups (Fig. 8). In contrast and consistently to testicular data, the levels of H3K4me2 were increased in F0-BA compared to F0-Ctrl mice (Fig.8).

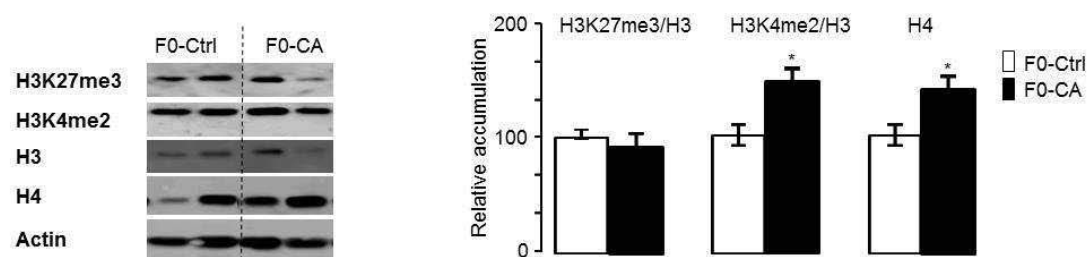


Figure 8. BA exposure affects epigenetic marks in spermatozoa. Immunoblots of H3K27me3, H3K4me2 and H3 on spermatozoa protein extracts of F0-Ctrl and F0-CA mice (n=6-10 per group). Quantification of H3K27me3 and H3K4me2 protein accumulations compared to H3.

Discussion

Growing evidences show that environmental factors can influence susceptibility to diseases during specific developmental periods in particular regarding testis physiology [13], [14]. These studies highlight some transgenerational inheritance due to germ line modifications from exposure in F0. In that line, our studies highlights the effects of BA on abnormal development of F1 pups from BA-exposed fathers. These pups present high perinatal mortality (50% F1). Surviving pups have growth defects as early as 8-days postpartum. In addition, these symptoms were observed in the F2 progenies, demonstrating for the first time the transgenerational effects of BA exposure. We demonstrate the major role of TGR5 in this signaling. These results are consistent with our previous study showing that in adult testis TGR5 is mainly expressed within germ cell lineage. They could be of particular interest regarding potential impact of TGR5 signalling pathways on germ cells and then progenies in the context of liver diseases when bile acids, natural ligands of TGR5, are increased. This also opens new field of research in the context of the use of TGR5 agonist in the treatment of diseases such as obesity.

Our study of the generational transmission of deleterious effects in male lineage is consistent with previous study on cholestasis during pregnancy. This work showed a transmission of metabolic diseases in the offsprings on women with pregnancy cholestasis (ICP)[15]. In this study some sexual dimorphism was observed. Indeed F1 males had increased body mass index (BMI), and females exhibited increased waist and hip girth. These data were confirmed using mouse model of ICP. Strikingly, females from cholestatic mothers developed a severe obese, diabetic phenotype with hepatosteatosis but only following a Western diet, what was not the case of offspring from “control” mothers. It could be of interest to challenge pups obtained from F0-CA fathers with high fat diet to define if they will develop metabolic syndrome.

Interestingly, it is well known that ICP could induce offspring mortality. Altogether these data suggest that BA exposure (of mothers and fathers) impact key genes of development leading to death of progenies. The phenotype of offspring during ICP was correlated with the accumulation of lipids in the fetoplacental unit

and increased transplacental cholesterol transport. IN order to explain the important mortality rate observed in progenies of F0-CA males, it could be of interest to focus on paternally expressed genes in placenta (Xang 2013).

Altered spermiogenesis. Histone to protamine transition requires sequence of events such as H4 hyperacetylation, histone variant expression, nucleosome eviction and DNA damage repair. Thus, to decipher how BAs impact spermiogenesis, an important point will be to identify the altered mechanisms leading to the default in nucleus condensation. Here, we define that BA-diet leads to lower accumulation of H4-ac which could be consistent with histone retention. Indeed, in histones fail to be replaced from the chromatin in the absence of histone H4 acetylation [16]. Following acetylation, H4ac interacts with Brdt first which then recruits Smarce1, a subunit of the SWI/SNF family of ATP-dependent chromatin remodelers [17]. During this histone to protamine transition, there is a relaxation of DNA and physiological DNA strand breaks (DSB) for histone removal. Spermatids (haploid cells) cannot repair these DSB by homologous recombination [18]. Appearance of DSB induces the formation of poly(ADP-ribose) by PARPs which then allows recruitment of DNA repair complexes. The major role of PARPs was defined as PARP inhibition results in altered chromatin condensation and histone retention in mature sperm [19]. If F0-BA showed altered DNA condensation of spermatid, they surprisingly had lower levels of cleaved PARP-1 in testis of F0-CA compare to control group. This could suggest that PARP-1 could be hyperactivated. The dynamic of PAR metabolism relies on removal of PAR by PARG. PARG KO model showed in altered DNA condensation in spermatid as well as infertility which is associated with increased poly(ADP-ribose) level [20]. Thus the hyperactivation of PARP-1 observed in F0-CA could be consistent with the abnormalities of spermiogenesis. However, PARP-1 auto-modification results in its inactivation. *Thus to decipher the status of PAR metabolism in F0-CA mice, we need to study the levels of PARG, PARP2 and of poly(ADP-ribose).*

Histone code. In spermatozoa a certain

fraction of histones are not removed during replacement by protamines. Remaining nucleosomes are replaced by maternal nucleosomes in the zygotes. It has been suspected that these nucleosomes must be important for some developmental processes. They are thought to be potential signal of paternal inheritance. In that line, several studies identified that remaining nucleosomes are enriched in DNA sequences of genes (promoter or exons) [21] in imprinted genes and developmental genes such as the HOX genes [22]. ***This could be of great interest for us to define using high-throughput approaches which genomic region might have retained histone in F0-CA mice in order to identify the putative origin of the increased mortality.***

However, recent studies showed contradictory results with nucleosomes retained in gene-poor regions [23], [24]. Thus further studies will be necessary to identify the genomic region where nucleosomes are retained. Moreover the identification of their states (modification, variant) could be useful to give idea of their potential roles.

Locus *Kcnq1ot1* (testis vs spz???). If *Kcnq1ot1* was found altered in the testis of F0-BA males, the analyzed DNA methylation level of the DMR in spermatozoa was not affected. Thus either this DNA methylation was not affected at all or it could be possible that it might be a restricted area of DNA that is altered. Indeed, the method used we did not cover all CpG islands of the DMR. We now need to use a more sensitive method such as bisulfite conversion followed by DNA sequencing. With this approach, restricted altered DNA methylation could also be identified in other regions than *Kcnq1ot1* DMR.

However, no modification of *Cdkn1c*, the other gene of this imprinted locus, was observed suggesting that no big alteration of DNA methylation level must be involved. Thus other transcriptional factor might be involved in the testicular alteration of *Kcnq1ot1* expression.

Long non Coding RNA. *Kcnq1ot1* is a lncRNA. Interestingly, microarray analysis showed that around 25% of the genes altered by BA-diet correspond to Long Non Coding RNA (lncRNAs). Interestingly, it has been recently demonstrated lncRNAs accumulate

during the meiotic and postmeiotic stages of spermatogenesis in mammals [25]. lncRNA represent a class of regulatory molecule, which are defined as transcripts of more than 200 nucleotides (nt) in length that lack significant open reading frames [26]. Their roles have been demonstrated in several physiological processes [26] as well as in diseases [27]. lncRNAs act different ways [28]. They can modulate gene expression at transcriptional, post-transcriptional (splicing, silencing). They can also regulate translation. Moreover, lncRNAs can induce epigenetic modification via the polycomb repressive complex 1/2 (PRC1) or G9a. Interestingly, they can interact with the LSD1/CoREST/REST complex [29] and MLL/WDR5 complex [30]. ***This could thus be hypothesized that in response to BA-diet, lncRNA could be responsible to the altered pattern of H3K4me2 observed in testis and spermatozoa via interaction with LSD1 and/or MLL/WDR5 complexes. We need to better analyze the expression levels of LSD1 and MLL/WDR5.***

In conclusion, we demonstrate for the first time a transgenerational impact of father exposure to BAs. The next step will be to identify the molecular mechanisms involved in order to define the dark side of BAs. Analysis of epigenetic processes such as DNA methylation, histone modification as well as non coding RNA and comparison of their patterns in the multiple generations (from F0 to F2) will allow to decipher the common ones and thus identify those involved in these transgenerational transmissions. This work is part of the challenge in which many teams are involved which aim to discover how sperm transmit information issued from environmental/metabolic impregnation.

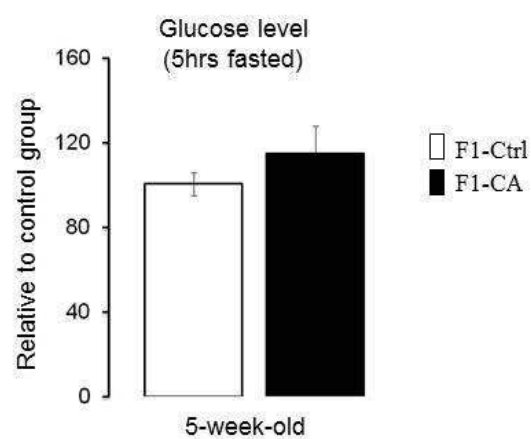
Acknowledgements: Volle's team is funded by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to MB), Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme to DHV), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to DHV), and ANR Jeune Chercheur (#1103 to DHV).

References.

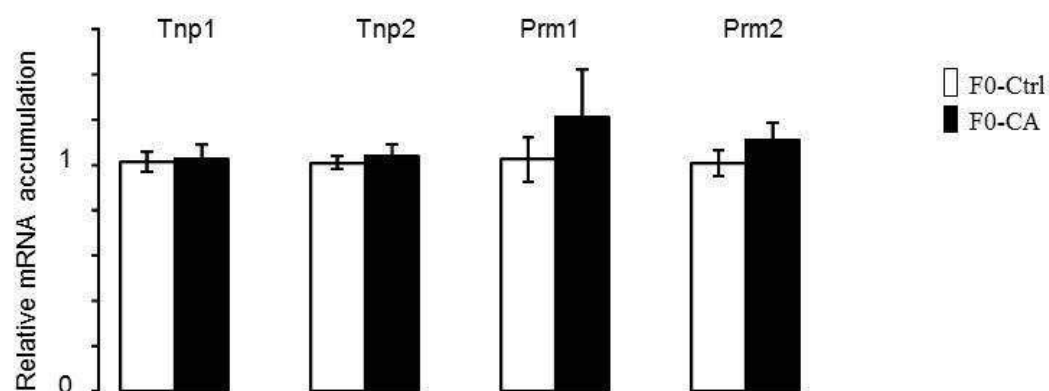
1. Skinner MK (2014) Environmental stress and epigenetic transgenerational

- inheritance. *BMC Med* 12:153. doi: 10.1186/s12916-014-0153-y
2. Curley JP, Mashoodh R, Champagne FA (2011) Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm Behav* 59:306–314. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.06.018
3. Godmann M, Lambrot R, Kimmins S (2009) The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc Res Tech* 72:603–619. doi: 10.1002/jemt.20715
4. De Waal E, Yamazaki Y, Ingale P, et al. (2012) Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:4163–4168. doi: 10.1073/pnas.1201990109
5. Skinner MK, Guerrero-Bosagna C (2014) Role of CpG deserts in the epigenetic transgenerational inheritance of differential DNA methylation regions. *BMC Genomics* 15:692. doi: 10.1186/1471-2164-15-692
6. Campos EI, Stafford JM, Reinberg D (2014) Epigenetic inheritance: histone bookmarks across generations. *Trends Cell Biol*. doi: 10.1016/j.tcb.2014.08.004
7. Yan W (2014) Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol Cell Endocrinol*. doi: 10.1016/j.mce.2014.09.008
8. Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, et al. (2007) The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21:303–315. doi: 10.1101/gad.409307
9. Baptissart M, Vega A, Martinot E, et al. (2014) Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* 60:1054–1065. doi: 10.1002/hep.27204
10. Pols TWH, Nomura M, Harach T, et al. (2011) TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab* 14:747–757. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.006
11. Viennois E, Esposito T, Dufour J, et al. (2012) Lxr α regulates the androgen response in prostate epithelium. *Endocrinology* 153:3211–3223. doi: 10.1210/en.2011-1996
12. Dembélé D, Kastner P (2014) Fold change rank ordering statistics: a new method for detecting differentially expressed genes. *BMC Bioinformatics* 15:14. doi: 10.1186/1471-2105-15-14
13. Volle DH, Decourteix M, Garo E, et al. (2009) The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 119:3752–3764. doi: 10.1172/JCI38521
14. Vega A, Baptissart M, Caira F, et al. (2012) Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3:150. doi: 10.3389/fendo.2012.00150
15. Papacleovoulou G, Abu-Hayyeh S, Williamson C (2011) Nuclear receptor-driven alterations in bile acid and lipid metabolic pathways during gestation. *Biochim Biophys Acta* 1812:879–887. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.11.001
16. Awe S, Renkawitz-Pohl R (2010) Histone H4 acetylation is essential to proceed from a histone- to a protamine-based chromatin structure in spermatid nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Syst Biol Reprod Med* 56:44–61. doi: 10.3109/19396360903490790
17. Dhar S, Thota A, Rao MRS (2012) Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling

- in mammalian spermiogenesis. *J Biol Chem* 287:6387–6405. doi: 10.1074/jbc.M111.288167
18. Boissonneault G (2002) Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. *FEBS Lett* 514:111–114.
 19. Meyer-Ficca ML, Lonchar JD, Ihara M, et al. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 modulate topoisomerase II beta (TOP2B) function during chromatin condensation in mouse spermiogenesis. *Biol Reprod* 84:900–909. doi: 10.1095/biolreprod.110.090035
 20. Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, et al. (2009) Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol Reprod* 81:46–55. doi: 10.1095/biolreprod.108.075390
 21. Erkek S, Hisano M, Liang C-Y, et al. (2013) Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 20:868–875. doi: 10.1038/nsmb.2599
 22. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, et al. (2009) Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 460:473–478. doi: 10.1038/nature08162
 23. Samans B, Yang Y, Krebs S, et al. (2014) Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. *Dev Cell* 30:23–35. doi: 10.1016/j.devcel.2014.05.023
 24. Carone BR, Hung J-H, Hainer SJ, et al. (2014) High-resolution mapping of chromatin packaging in mouse embryonic stem cells and sperm. *Dev Cell* 30:11–22. doi: 10.1016/j.devcel.2014.05.024
 25. Chalmel F, Lardenois A, Evrard B, et al. (2014) High-resolution profiling of novel transcribed regions during rat spermatogenesis. *Biol Reprod* 91:5. doi: 10.1095/biolreprod.114.118166
 26. De Lucia F, Dean C (2011) Long non-coding RNAs and chromatin regulation. *Curr Opin Plant Biol* 14:168–173. doi: 10.1016/j.pbi.2010.11.006
 27. Wapinski O, Chang HY (2011) Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 21:354–361. doi: 10.1016/j.tcb.2011.04.001
 28. Zhang K, Shi Z-M, Chang Y-N, et al. (2014) The ways of action of long non-coding RNAs in cytoplasm and nucleus. *Gene* 547:1–9. doi: 10.1016/j.gene.2014.06.043
 29. Cai B, Song XQ, Cai JP, Zhang S (2014) HOTAIR: a cancer-related long non-coding RNA. *Neoplasma* 61:379–391.
 30. Yang YW, Flynn RA, Chen Y, et al. (2014) Essential role of lncRNA binding for WDR5 maintenance of active chromatin and embryonic stem cell pluripotency. *Elife* 3:e02046.



Supplemental 1. Glucose levels in 5 weeks old F1-Ctrl and F1-CA after 5 hours of fasting.



Supplemental 2. Testicular mRNA accumulation of *Tnp1*, *Tnp2*, *Prm1* and *Prm2* normalized to β -actin in F0-Ctrl and F0-CA. In all panels data are expressed as the means \pm SEM. n=5-6 per group.

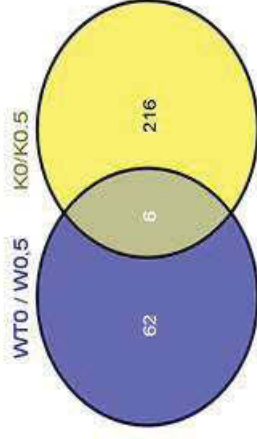
A Down-regulated genes

GeneName	FC2	F-Value
Cd80	0.21132	0.00790
Dlfr1095	0.44828	0.00810
ENSMUST00000099035	0.49586	0.00848
8430437003Rik	0.59015	0.00863
Gm5414	0.59589	0.00875
ENSMUST00000065489	0.61813	0.00879
Mlyod1	0.58470	0.00880
Gm4470	0.58172	0.00883
chr5:2633765-26338143_F	0.59959	0.00886
Rab3c	0.64260	0.00892
Adamdec1	0.59327	0.00895
A_55_P2106583	0.63892	0.00909
Chr2	0.58079	0.00910
Rhox8	0.63899	0.00919
chr8:26343277-26352902_R	0.65249	0.00927
chr5:26333765-26338143_F	0.64599	0.00932
Cxcl11	0.65076	0.00933
Kcnq1ot1	0.65141	0.00940
chr2:72825297-72826470_F	0.61938	0.00946
Icos	0.64884	0.00952
Ptgn	0.65536	0.00955
Mxip1	0.65714	0.00964
Serpinc1	0.65368	0.00964
Aldh3a1	0.65535	0.00971
chr11:97457180-97487074_F	0.62727	0.00984
chr13:108653722-108654406_R	0.64471	0.00984
chr14:76912477-76931702_F	0.64898	0.00987
ENSMUST00000099050	0.54169	0.00987
A1300721N09Rik	0.57617	0.00996
ENSMUST00000069042	0.51279	0.00999
A_55_P2148935	0.60273	0.01005
ENSMUST00000103553	0.61456	0.01015
ENSMUST00000099683	0.57618	0.01077
Ccn e2	0.39578	0.01078
A_55_P2028847	0.65441	0.01088
ENSMUST00000099683	0.56864	0.01092
chrX:120976609-120977281_F	0.63431	0.01107
8C099970	0.64448	0.01198
A_55_P2068247	0.60585	0.01201
A_55_P1986612	0.60517	0.01231
ENSMUST00000099046	0.56516	0.01322
ENSMUST00000099050	0.51021	0.01345
Ifna2	0.65421	0.01359

Up-regulated genes

GeneName	FC2	F-Value
5330439814Rik	1.51584523	0.98508846
Tcf7l2	1.84312379	0.98556522
Ctfr172	3.87964532	0.98619496
chr2:113880070-113887230_F	1.68755092	0.98681027
Klrf1	1.78757815	0.98723245
chr14:64735748-64736349_R	1.80768629	0.98771976
Egfr	1.78623457	0.98864943
Mmab	1.81934663	0.98893226
Schn1b	2.04555849	0.98893765
chr3:19793699-19822899_R	1.58257809	0.98940373
chr9:118060025-118085050_R	1.59229113	0.98983053
Ibsp	2.06466326	0.98988504
Hp	1.64839415	0.98989044
Tcl700876	1.52438292	0.99009076
chr19:5771425-5848475_R	3.27144649	0.9906028
E330024120Rik	1.64906681	0.99099149
Krtap3-3	1.63513135	0.99101061
Azgp1	1.58134592	0.9910547
Ctql4	1.88665996	0.99116595
Erd1	1.57918893	0.99138205
Syna	1.58507196	0.99139851
Agt2	1.54042253	0.99165379
Ly6a	1.55087014	0.9916972
Lg1	1.59046819	0.99192355
chr16:8738782-8830148_R	3.03669815	0.99206796

B



C Phenotype Ontology enrichment

Function	pvalue	Number of affected targets
abnormal homeostasis	0.02394946177563247	10
abnormal blood homeostasis	0.005742033793423986	9
abnormal renal/urinary system morphology	0.005883593998447067	5
liver/biliary system phenotype	0.017656585078891097	5
renal/urinary system phenotype	0.01940334431739875	5
embryogenesis phenotype	0.047487564917407174	5
abnormal extraembryonic tissue morphology	0.008611439149399153	4
increased sensitivity to induced morbidity/mortality	0.009433884575605555	3

D Gene Ontology enrichment

Biological process	pvalue	Number of affected targets
response to chemical	0.01518511662203351	28
cell proliferation	0.014958808491847785	24
regulation of cell proliferation	0.028533887877081205	24
inflammatory response	0.022480971497868097	20
positive regulation of cell proliferation	0.0009511300364526315	15
defense response	0.0037290827420148435	11
response to oxygen-containing compound	0.005807852229298018	11
response to wounding	0.0011523720821624386	9
cellular response to chemical stimulus	0.0028349061701159715	9
response to stress	0.006123058706586739	9
regulation of response to stimulus	0.0011688632749804632	8
response to organic substance	0.00703977003579783	7
cellular response to oxygen-containing compound	0.0021155075100903484	7
cell activation	0.01062953963726249	7
cellular response to organic substance	0.00151192013994081054	6
peptidyl-amino acid modification	0.011207600339909238	6
regulation of phosphorylation	0.0014290664423164988	5
regulation of biological process	0.00260171810068837	5
single-organism process	0.008028940237015529	5
response to stimulus	0.00914500435184371	5
stem cell maintenance	0.010987318561118713	5
biological regulation	0.03808089990406011	5
regulation of gene expression by genetic imprinting	0.02724154561963635	3
reproductive structure development	0.03328864382542903	3

Supplemental 3. **(A)** List of down- and up-regulated genes in F0 males mice fed BA-diet compared to control group. **(B)** Analysis of the common genes deregulated by BA-diet in Tgr5^{+/+} and Tgr5^{-/-} F0 males. **(C)** Phenotype ontology upon analysis of BA-deregulated genes in testis of F0 males defined using Mousemine. **(D)**. Gene ontology upon analysis of BA-deregulated genes in testis of F0 males defined using Mousemine.

Gene Name	FW	Rev
Pepck	CCACAGCTGCTGCAGAACA	GAAGGGTCGCATGGCAAA
G6Pase	CCGGATCTACCTTGCTGCTCACTTT	TAGCAGGTAGAATCCAAGCGCGAAAC
Dnmt1	TCTCTCTCCTCTGCAGCCGACTCA	CCTAGTTCCGTGGCTACGAGGAGAA
Dnmt3a	CGACCCATGCCAAGACTCACCTTCCAG	AGACTCTCCAGAGGCCTGGT
Dnmt3a2	CCAGACGGGCAGCTATTTAC	AGACTCTCCAGAGGCCTGGT
Dnmt3b	TTCAGTGACCAGTCCTCAGACACGAA	TCAGAAGGCTGGAGACCTCCCTCTT
Dnmt3l	GAGACTGGCAATAACTGTGG	AGTGACTGGCCTCTTGAATG
Ezh2	CCTCTGAAGCAAATTCTCGG	ACATCCTCAGTGGGAACAGG
G9a	ATGTCCAAACCTAGCAACG	TGCATGTCATCACTCATGCG
Suv39h1	TTTCTTGTCTGCCCCTTGG	CTAAGTCCTTGTGGAAGTGC
Suv39h2	GATGAGTTCACAGTGGATGC	GAGAACAATGCTATCCTGGG
Mest	TCGTTGCTCAGGAAGTGTGTA	GATGCGTCTCAGGAAAGATACCTC
Rtl1	TGAGGCTTAGGGTGATAGAGAACG	TCGTGGAGAACTTCGCTGTCAT
Gtl2	TTGCTGTTGTGCTCAGGTTC	GATGATGGCTTTGGCCTAATC
H19	CAT GTC TGG GCC TTT GAA	TTG GCT CCA GGA TGA TGT
Piwi1	TGAACACCTGAGCTGACTGG	GAAACCCAGCTGAGATCTGC
Piwi2	TGCTAACATGGTCCGCAAGG	AGAGAGACCTCAGAACTACC
Prm1	CAAAATTCCACCTGTCACA	ACGCAGGAGTTTTGATGGAC
Prm2	CCAGTGAGGGTCAGCACCAG	TCTGCAGCCTCTGCGATGCC
Beta actin	TCATCACTATTGGCAACGAGC	AGTTTCATGGATGCCACAGG

Supplemental Table 1. List of primers used.

H4	Millipore, cat 07-108
H4ac	Millipore, cat 06-946
H3	Santa Cruz Sc-8654 (C-16)
H3K27me3	Cell Signaling,]#9733
H3K4me2	Cell Signaling, #9725
PARP-1	Trevigen, 4338-MC-50 (C2-10)
Tubulin	Sigma, T 6074

Supplemental Table2. List of the antibodies used.

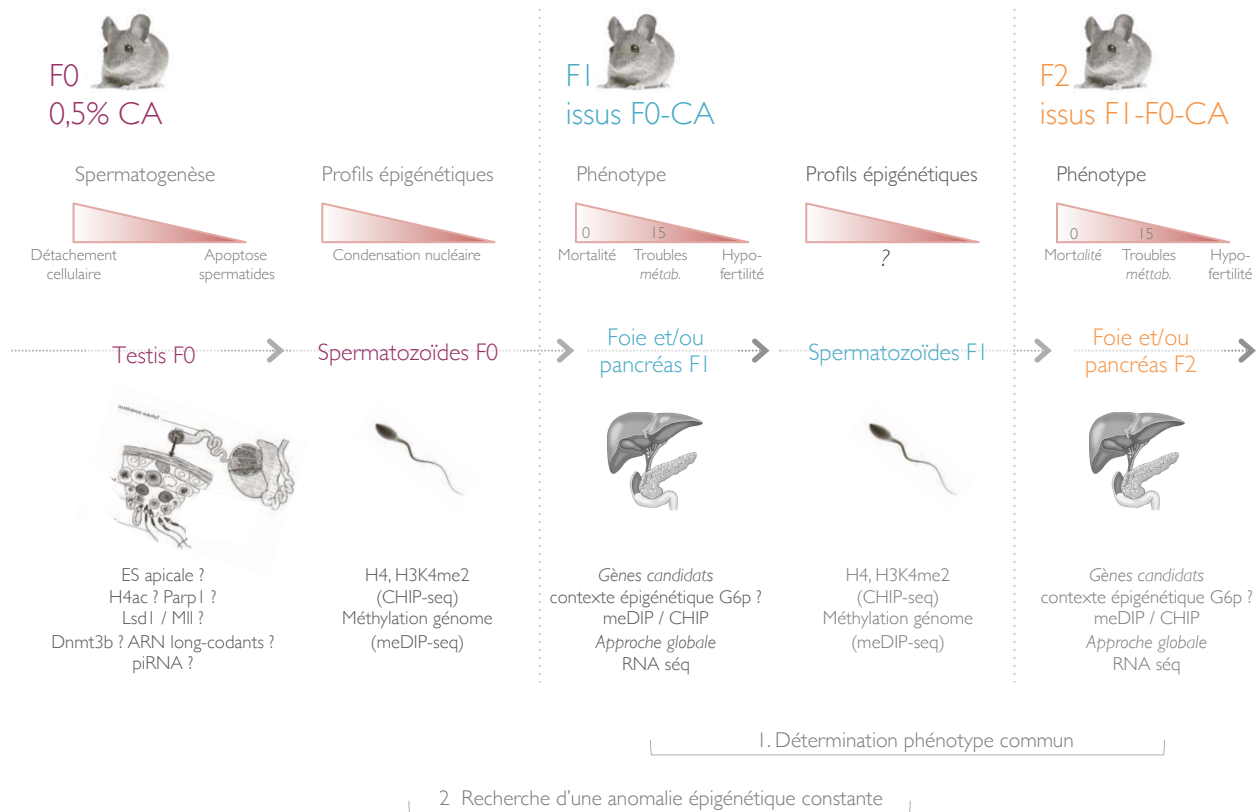


Figure 33. Recherche du lien épigénétique transgénérationnel en réponse aux acides biliaires : stratégies d'analyses.

Deux approches parallèles et complémentaires seront menées afin de déterminer l'altération épigénétique à l'origine de l'impact transgénérationnel d'une exposition aux acides biliaires. 1, Nous rechercherons un tableau phénotypique commun aux générations F1 et F2 et en déduirons des gènes candidats dont la dérégulation pourrait être le « fil rouge » de l'atteinte transgénérationnelle. 2, Nous identifierons le phénomène épigénétique altéré dans le gamète F0 et rechercherons la constance de cette anomalie dans le gamète F1.

ES, *Ectoplasmic specialization* ; H4ac, H4 acétylée ; Lsd1, *Lysine specific demethylase* ; Mll, *Mixed lineage leukemia* ; Dnmt3b, *DNA méthyltransferase 3 b* ; CHIP-seq, *Chromatine immuno precipitation – sequencing* ; meDIP-seq, *Methyl DNA immunoprecipitation sequencing* ; G6p, *Glucose 6 phosphatase* ; CA, *Cholic acid*

Discussion et perspectives, Article II

Chez l'Homme, les exemples de transmission transgénérationnelle de par le père sont rares et déduits de tendances démographiques. Dans une étude épidémiologique suédoise, le risque de développer des complications cardiovasculaires ou un diabète de type 2 est partiellement déterminé par l'alimentation des parents et grands-parents lors de leur préadolescence ; un grand-père au comportement alimentaire excessif (surnutrition) transmettra à ses petits-enfants un risque multiplié par quatre de développer un diabète de type 2 (Kaati et al., 2002). Il est par ailleurs décrit qu'un père atteint de trouble métabolique (obésité, diabète) donnera naissance à des nourrissons de poids inférieur à la normale et présentant une susceptibilité à développer à leur tour un syndrome métabolique (Hyppönen et al., 2003 ; Lindsay et al., 2000).

Notre étude définit la dérégulation du métabolisme des acides biliaires comme une nouvelle composante physiopathologique aux impacts transgénérationnels. En effet, à l'atteinte quantitative d'une diminution du nombre de fécondations (Baptissart et al., 2014), se rajoute une atteinte qualitative de la descendance des mâles exposés aux acides biliaires : mortalité périnatale, anomalies du poids du corps, diabète néonatal transitoire, atteintes de la fertilité chez les mâles adultes. Ces anomalies phénotypiques (périnatales et néonatales) sont transmises à la descendance jusqu'en 2^{ème} génération. L'utilisation de souris invalidées pour *Tgr5* a permis de démontrer que ces conséquences transgénérationnelles sont dépendantes des signalisations Tgr5.

Au cours de cette dernière décennie, plusieurs modèles expérimentaux ont été développés afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires à la base de la transmission par le gamète mâle. Ces derniers révèlent que, tout comme l'information portée par la séquence du génome (mutations), les caractéristiques épigénétiques du spermatozoïde (code histone, méthylation génomique, transcrit non codant) peuvent être transmises à travers les générations décrivant un nouveau concept d'hérédité (pour revue : Rando, 2012). Dans notre modèle, l'hypofertilité des mâles F0 exposés aux acides biliaires est associée à une dérégulation des mécanismes de mise en place de l'épigénome des cellules germinales (décondensation, H4ac, Parp1, Dnmt3b) en lien avec un déséquilibre de la composition chromatinienne des spermatozoïdes (niveaux H4 et H3K4me2).

Ces atteintes épi-mutationnelles pourraient-elles constituer le médiateur du phénotype transgénérationnel hérité d'une exposition aux acides biliaires ?

Pour résoudre cette problématique, nous faisons le choix de mener deux stratégies parallèles et complémentaires (Figure 33).

1) Rechercher un tableau phénotypique commun aux générations F1 et F2 et en déduire des gènes candidats dont la dérégulation pourrait être le « fil rouge » de l'atteinte transgénérationnelle.

2) Identifier le phénomène épigénétique altéré dans le gamète F0 et rechercher la constance de cette anomalie dans le gamète F1.

1. Rechercher un tableau phénotypique commun aux générations F1 et F2 et en déduire des gènes candidats dont la dérégulation pourrait être le « fil rouge » de l'atteinte transgénérationnelle.

Parmi les exemples de la littérature, rares sont ceux qui ont permis d'isoler l'altération épigénétique à la base de la transmission d'un trait phénotypique (Wei et al., 2014).

La difficulté de la recherche du lien transgénérationnel en réponse aux acides biliaires sera d'autant plus grande que nous révélons une atteinte relativement hétérogène de la descendance issue des mâles F0 (F1 et F2). Certains individus présentent des anomalies de développement et meurent *in utero* ; d'autres ne survivent que quelques jours après la mise bas ; la moitié d'entre eux atteignent l'âge adulte où ils présentent alors des troubles du métabolisme glucidique et des atteintes de la fertilité. Bien que complexifiant l'étude, cette variabilité phénotypique demeure cohérente avec l'hétérogénéité de l'atteinte histologique et moléculaire des spermatozoïdes F0 (gradients de condensation nucléaire, analyses *western-blot* de la composition chromatinienne).

Plusieurs éléments laissent néanmoins suggérer qu'il puisse exister une altération commune héritée de l'exposition aux acides biliaires.

- Un phénotype homogène est observé entre les individus d'une même génération à une étape donnée de leur développement (périnatale/mortalité, 15j/diabète, adulte/hypofertilité).
- Nous reproduisons les mêmes profils d'atteintes phénotypiques entre les deux générations F1 puis F2.

Parmi les paramètres mesurés dans notre étude, les générations F1 et F2 présentent à 15 jours un tableau phénotypique relativement homogène. Une diminution du poids du corps est associée à une hyperglycémie. Cette dernière s'accompagne d'une augmentation des transcrits hépatiques codant la G6p, enzyme principale de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse.

Ces observations suggèrent que la dérégulation de l'expression de la *G6p* puisse être l'une des anomalies liée au phénotype transgénérationnel observé. Suivre les paramètres épigénétiques responsables du contrôle de son expression pourrait illustrer l'atteinte transgénérationnelle que nous mettons en évidence. Pour répondre à cette hypothèse, nous analyserons le statut épigénétique des régions régulatrices de la *G6p* au niveau du foie des individus F1 et F2. Nous procéderons selon 2 approches : 1- analyse par meDIP (*Methylated DNA immunoprecipitation*) des niveaux de méthylation des régions régulatrices ; 2- étude du contexte histone par CHIP (*Chromatin immunoprecipitation*) en

focalisant en premier lieu sur la marque H3K4me2 que nous avons montré affectée au niveau spermatique (génération F0). Nous transposerons ces analyses aux spermatozoïdes F0 et F1 afin de lier cette anomalie au phénomène d'hérédité transmise par le gamète.

Bien que constante et associée à un même phénotype sur 2 générations, il est concevable que l'altération du contexte épigénétique de la *G6p* ne soit pas celle portée par les gamètes F0 et F1. Il est en effet envisageable qu'elle ne soit simplement la conséquence de la dérégulation d'autres acteurs qui de manière directe ou non en contrôlent l'expression. Ce scénario relevant la complexité de l'étude des phénomènes à la base de l'hérédité d'un phénotype transgénérationnel est notamment illustré par les travaux de Carone et ses collègues en 2010 (Carone et al., 2010). Les petits issus de mâles nourris par un régime carencé en protéine présentent des dérégulations des niveaux de transcrits de plusieurs acteurs du métabolisme des lipides au niveau hépatique. Ce profil a pu être associé à une dérégulation de l'expression de *Ppara* consécutive à une hyper-méthylation de ses régions régulatrices dans le foie ; cette dernière n'a cependant pas été retrouvée au niveau du génome spermatique des souris F0 et malgré des approches à grande échelle menées à la fois sur le foie de la descendance et les spermatozoïdes F0 les auteurs ne sont pas parvenus à mettre en évidence le « fil rouge » expliquant le lien entre l'atteinte paternelle et celle de la descendance. Si nous sommes amenés à constater un tel scénario :

- il nous faudra élargir notre approche gène candidat et faire appel à une analyse globale du transcriptome des tissus d'intérêts chez les individus F1 et F2 (pancréas, foie). Les conclusions de cette analyse nous permettront d'identifier d'autres gènes dont la dérégulation de l'expression pourrait être associée à une altération de leur contexte épigénétique dans le gamète.
- cette approche sera soutenue par l'analyse de la qualité de l'épigénome des gamètes F0 et F1.

2. Identifier le phénomène épigénétique altéré dans le gamète F0 et rechercher la constance de cette anomalie dans le gamète F1.

2.1. Le code histone du gamète

Chez la souris, 1 à 4% du génome du spermatozoïde mature demeure associé aux histones (Hammoud et al., 2011)(Brykczynska et al., 2010). Après la fécondation, ces dernières seront maintenues sur le génome paternel tandis que les protamines seront rapidement remplacées par les histones du pronucléus femelle (Ooi and Henikoff, 2007). Ce contexte chromatinien particulier permet de réguler le programme transcriptionnel nécessaire au développement précoce de l'embryon. Les histones héritées du spermatozoïde orienteront les processus de déméthylation-méthylation du génome du zygote et influenceront de cette manière la détermination de l'identité des cellules somatiques (Hales et al., 2011)(Erkek et al., 2013)(Ihara et al., 2014). Le contexte chromatinien qui leur est

associé pourrait également guider les événements de reprogrammation de l'épigénome des PGCs (Mansour et al., 2012)(Nakamura et al., 2012)(Szabó and Pfeifer, 2012). De cette façon le code histone du spermatozoïde est un messager transgénérationnel à part entière.

a. Quelle est la composition chromatinienne des spermatozoïdes F1 ?

Une analyse de microscopie électronique nous a permis de mettre en évidence une anomalie de condensation du noyau des spermatides chez les mâles F0 soumis à un régime supplémenté en acide cholique. Plusieurs références bibliographiques associent ce phénomène à une altération de la transition histone-protamine lors de la spermiogenèse (Ihara et al., 2014; Meyer-Ficca et al., 2011). Alors qu'il est concevable que les noyaux les plus diffus soit associés à une apoptose des spermatides ou à la perte des capacités fécondantes des spermatozoïdes (Baptissart et al., 2014), des décondensations plus fines peuvent être le signe d'une rétention anormale des histones se répercutant sur la qualité de l'information génétique transmise à la descendance.

Dans ce sens, nous montrons une rétention anormale de l'histone H4 et de la marque H3K4me2 dans les spermatozoïdes extraits à partir de la queue de l'épididyme de souris sauvages F0 soumises à un régime 0,5% CA. Aucune modulation des niveaux d'accumulation de l'histone H3 ou de la marque H3K27me3 n'a pu être mise en évidence. Il nous faudra poursuivre notre analyse afin d'établir un portrait plus exhaustif de la composition chromatinienne des spermatozoïdes F0.

- Nous évaluerons par *western-blot* les niveaux d'accumulation des variants H3.3, TH2B, HILS1 ou macroH2A ; ces derniers sont montrés comme anormalement retenus dans les spermatozoïdes de modèles murins associés à une décompaction chromatinienne (Ihara et al., 2014; Meyer-Ficca et al., 2011).
- De la même manière, nous quantifierons les niveaux des marques H3K4me3, H3K9me2/3 ; ces dernières, tout comme H3K4me2, jouent un rôle clef pour la dynamique d'expression des gènes du développement précoce de l'embryon (Hammoud et al., 2011)(Ihara et al., 2014).
- Cette étude sera réalisée en parallèle sur les spermatozoïdes F0 des souris *Tgr5*^{-/-} dont on sait qu'ils ne transmettent pas de phénotype F1 délétère en réponse aux acides biliaries.

La combinaison de ses approches nous permettra de sélectionner les marqueurs épigénétiques pertinents pouvant être à l'origine d'une altération du message héréditaire entre les spermatozoïdes F0 et les individus F1.

b. Contexte chromatinien : du F0 au F1

Plusieurs études montrent qu'une même atteinte chromatinienne peut être transmise à la descendance (Seong et al., 2011)(Greer et al., 2014). L'invalidation de *Srp-5*, gène orthologue de la déméthylase Lsd-1 (H3K4me1/2 déméthylase) chez *C. elegans*, se traduit par une accumulation

anormale des niveaux de la marque H3K4me2 (Greer et al., 2011). Celle-ci est maintenue sur 20 à 30 générations alors que dans le même temps la mutation s'est dissipée. Il est par ailleurs intéressant de noter qu'un phénotype de stérilité progressive est relevé chez les générations de vers issus des souches F0 mutantes (*Srp5*^{-/-}). Cette expérience démontre qu'il existe une « mémoire » de la composition chromatinienne au travers les générations. Ces conclusions sont encourageantes pour imaginer conserver l'atteinte H3K4me2 dans les spermatozoïdes F1.

- Nous répondrons à l'hypothèse de l'implication transgénérationnelle de cette marque par l'analyse *western-blot* des niveaux d'H3K4me2 sur les gamètes F1 dont nous disposons.
- Il nous faudra parallèlement établir le profil chromatinien global des spermatozoïdes F1 tel que nous l'aurons fait pour les spermatozoïdes F0.

c. Quels sont les gènes concernés ?

Après avoir sélectionné le marqueur chromatinien commun aux deux générations de gamètes, nous suivrons sa localisation sur les génomes des spermatozoïdes F0 et F1 grâce à une approche de *CHIP-seq*.

- Nous sélectionnerons les régions géniques différentielles entre les spermatozoïdes issus des animaux témoins ou traités par un régime 0,5% CA. Ceci nous permettra de définir des gènes candidats dont la dérégulation du contexte chromatinien pourrait être à l'origine du phénotype transgénérationnel.
- Leur niveau d'expression ainsi que le contexte histone de leurs séquences régulatrices seront suivis dans les organes d'intérêt des souris F1 et F2 (foie et/ou pancréas).

2.2. Le code histone : retour aux origines F0

Nos données montrent à ce jour deux acteurs chromatinien accumulés anormalement dans les spermatozoïdes F0. La rétention de l'histone H4 peut être attribuée à une anomalie de la transition histone-protamine durant la spermiogenèse. Or plusieurs acteurs de cette transition se trouvent dérégulés dans le testicule des animaux F0 en réponse aux acides biliaires. C'est le cas de la perte d'intégrité des ES, de l'hyperacétylation de l'histone H4 (H4-ac), ou encore du statut de Parp1. La présence aberrante de l'histone H3K4me2 dans le gamète F0 pourrait, quant à elle, être la résultante d'une dérégulation d'acteurs spécifiques de la mise en place de la marque. Identifier les phénomènes à l'origine de ces altérations permettrait de définir les modes d'action par lesquels les acides biliaires et Tgr5 sont capables d'impacter les générations futures.

a. La rétention d'histones : de l'ES apicale à un défaut de spermiogenèse.

Le stade de spermatide se caractérise par des transformations morphologiques majeures de la cellule germinale indispensables à la formation d'un spermatozoïde fonctionnel et de qualité. Les cellules germinales s'orientent la tête en avant dans les cryptes sertoliennes. La morphologie du

noyau change et s'allonge, les vésicules golgiennes fusionnent pour former l'acrosome et la chromatine se condense. Les données bibliographiques montrent clairement que l'ensemble de ces phénomènes sont interdépendants et que la formation des ES apicales est requise pour le bon déroulement de ces étapes. La formation du TBC, structure dérivée des ES apicales, est nécessaire à la formation de l'acrosome (Tanii et al., 1999) ; acrosome qui lui même est essentiel à la condensation de la chromatine. D'autre part, la morphogenèse des structures cytosquelettiques intervenant dans l'aplatissement du noyau (manchette, anneau périnucléaire) sont dépendantes de la présence des ES apicales et en interaction étroite avec le processus de compaction de l'ADN (Kierszenbaum et al., 2002). La protéine Ran GTPase en est l'une des illustrations : ancrée dans le cytosquelette périnucléaire (manchette), elle permet le transport et l'échange des histones au profit des protamines (Kierszenbaum et al., 2002). Par ailleurs, un modèle de perturbation des ES apicales basé sur l'invalidation de la *β -Caténine* germinale, montre une décondensation des spermatides associée à une dérégulation de l'expression des gènes codants *Arpc5* et *Dtl* (Chang et al., 2011). Au stade de spermatide, *Arpc5* conduit les ARNm à la machinerie traductionnelle ; il serait dans ce sens clef pour la production des nouveaux constituants de la chromatine (protéines de transition, protamine) (Chang et al., 2012). *Dtl* est quant à lui un membre de la famille des E3 ligase essentiel pour prévenir la compaction précoce de l'ADN (Higa et al., 2006).

Dans notre modèle d'exposition aux acides biliaries, la perte des jonctions intercellulaires est associée à une décondensation nucléaire des spermatides. En lien avec les données bibliographiques, il serait intéressant de répondre à la question suivante : *Existe-t-il une corrélation stricte entre la perte des ES et le phénomène de décompaction chromatinienne ?* Nous savons que le phénotype de déstructuration des jonctions intercellulaires est restauré chez les souris *Tgr5*^{-/-}. Si l'hypothèse d'une interrelation entre ces deux événements existe, la décondensation des spermatides devrait, elle aussi, être reversée chez les individus de génotype *Tgr5*^{-/-}.

- Une nouvelle cohorte d'animaux sauvages et *Tgr5*^{-/-} est actuellement en cours de traitement par un régime témoin ou 0.5% CA. Elle sera consacrée à une approche de microscopie électronique à partir de laquelle nous comparerons, pour chacun des génotypes, les événements de décondensation des spermatides en réponse aux acides biliaries.
- L'intégrité des ES et les structures caractéristiques de la tête des spermatides sont visualisables par microscopie électronique. Nous rechercherons l'existence d'une corrélation entre la qualité de ces structures et les événements de décondensation.
- En cohérence avec la littérature, nous vérifierons le statut d'expression (qPCR) ainsi que la localisation (immunohistochimie) des acteurs *Arpc5*, *Dtl* ou Ran GTPase dans le testicule de souris sauvages ou *Tgr5*^{-/-}, exposées ou non aux acides biliaries.

b. La rétention d'histones et le signal H4-ac.

L'hyper-acétylation de l'histone H4 constitue l'un des signaux initiateurs de la transition histones-protamines. Elle favorise la dissociation des nucléosomes à l'ADN et constitue un signal moléculaire reconnu par les protéines BrdT ; ces dernières joueront le rôle de plateforme de recrutement du complexe de remodelage chromatinien Swi/Snf. Plusieurs travaux soulignent l'importance de ces acteurs dans le processus de spermiogenèse et le maintien de la fertilité (Shang et al., 2007)(Berkovits and Wolgemuth, 2011)(Winston and Allis, 1999)(Pivot-Pajot et al., 2003). Chez l'homme ou la souris, le déséquilibre des niveaux d'acétylation est associé à des défauts de différenciation de la lignée germinale conduisant à la stérilité (Sonnack et al., 2002)(Fenic et al., 2004).

Nous observons une diminution des niveaux d'H4-ac sur des extraits protéiques de testicule total de souris F0 nourries par un régime acides biliaires. Celle-ci apparaît cohérente avec la rétention de l'histone H4 mesurée dans les spermatozoïdes des mâles correspondants. Ces données suggèrent qu'une défaillance du signal d'hyper-acétylation pourrait être responsable d'une altération de l'épigénome du gamète. Ces résultats devront être complétés sur plusieurs aspects.

- Tout comme pour les autres paramètres, l'utilisation de souris *Tgr5*^{-/-} nous permettra d'associer ou non le phénomène H4ac à l'impact transgénérationnel.
- Nous comparerons chez les souris sauvages exposées ou non aux acides biliaires, la capacité de recrutement des complexes BrdT/Swi-Snf sur une région témoin de la chromatine (méthodologie par immuno-précipitation).
- Le niveau d'acétylation est la résultante de l'activité de deux familles d'enzymes antagonistes: les histone-acétyltransférases (HAT) et les histone-désacétylases (HDAC). Une analyse transcriptomique relève une augmentation non significative de l'expression de plusieurs membres de la famille des histones acétyltransférases (Kat2a, Kat6a, Kat8) dans des extraits de testicule d'animaux nourris par un régime 0,5% CA. Il sera intéressant de valider cette tendance par des approches complémentaires de qPCR. Nous compléterons cette analyse par la quantification de l'accumulation protéique de ces mêmes acteurs par *western-blot*.

c. La rétention d'histones : l'hypothèse Parp1.

La dissociation des histones à l'ADN est facilitée par l'ajout de polymères d'ADP ribose par les enzymes Parp1 et Parp2. Lors de la spermiogenèse, la cinétique d'action des Parps est finement régulée afin d'assurer une relaxation transitoire de la chromatine. Cet équilibre est assuré par deux événements : 1) les Parp1-2 sont leurs propres cibles et l'ajout de groupement PAR à leur structure répriment leur action en limitant leur liaison à l'ADN ; 2) sous l'action de l'enzyme Parg les résidus PAR sont rapidement dégradés : l'action des Parp sera alors restaurée. Elles pourront de cette façon intervenir sur un nouveau site chromatinien. Le maintien de cette cinétique d'action est nécessaire à la production de spermatozoïdes matures et fonctionnels capables de générer une descendance saine.

Chez la souris, l'inhibition pharmacologique de Parp1-2, ou l'invalidation des gènes codant *Parp1* ou *Parg*, entraîne une rétention anormale des nucléosomes, une décondensation du noyau des spermatozoïdes ainsi qu'une hypofertilité (Meyer-Ficca et al., 2009, 2011). Celle-ci est associée à des dérégulations du programme transcriptionnel du zygote (Ihara et al., 2014).

Une approche *western-blot* sur testicule total nous a permis de mettre en évidence un défaut de clivage de Parp1 chez les souris sauvages soumises à un régime acides biliaries. Le clivage de Parp1 est l'un des processus permettant son inactivation (Amé et al., 2004). Il est donc suggéré, qu'en réponse aux acides biliaries, l'activité de Parp1 soit anormalement maintenue et que son action à la chromatine soit de cette façon limitée. Ce modèle pourrait contribuer au défaut de structure chromatinienne des spermatozoïdes F0 et au phénotype F1 qui en résulte. Pour en valider l'implication, il serait nécessaire de réaliser des expériences complémentaires.

- Nous mesurerons par immuno-précipitation les niveaux de PARylation de Parp1 elle-même, ainsi que ceux de deux de ces cibles chromatinienne (H1t et Hils1) dans des extraits de testicule d'animaux soumis ou non au régime 0,5% CA.
- Nous vérifierons en parallèle le statut des autres acteurs de l'homéostasie des PARs : les niveaux d'accumulation protéique de Parg et de Parp2 seront mesurés par *western-blot* sur testicule total.
- L'analyse de ces mêmes paramètres sur les souris *Tgr5*^{-/-} permettra de trancher définitivement sur leur intervention dans le phénotype F1.

d. Augmentation des niveaux d'H3K4me2 : qui sont les responsables ?

Aucune modulation significative de l'accumulation de H3 n'a été mise en évidence dans les spermatozoïdes F0 des mâles exposés aux acides biliaries. Pour autant, nous observons une augmentation des niveaux de la marque H3K4me2. Ces observations montrent qu'au delà de l'aspect quantitatif d'une rétention d'histone, il existe une altération du « code » porté par ces dernières. *Quels acteurs pourraient en être responsables ?*

- Nous analyserons à partir des extraits testiculaires de souris témoins ou 0,5% CA, sauvages ou *Tgr5*^{-/-}, les niveaux d'expression des membres du complexe histone-méthyl-transférase Mll (Wdr5, Bbp5, Ash1l2l) ainsi que ceux des déméthylases d'histone Kdm1a (Lsd1), Kdm1b ou Kdm5a.

Plusieurs arguments suggèrent que, dans notre modèle, les acteurs de « l'homéostasie H3K4me2 » ne soient pas régulés uniquement sur le plan transcriptionnel. Parp1 est par exemple reconnu comme régulant l'activité de plusieurs membres de la famille des Kdm. Chez la souris, l'absence de Parg se traduit par une hyper-PARylation de Kdm4d ; celle-ci se retrouve incapable de retirer les groupements méthyls H3K9 (Krishnakumar and Kraus, 2010). Il est dans ce

cadre envisageable qu'en réponse aux acides biliaires un tel événement ait lieu envers Lsd1 ou Kdm5a.

- Pour répondre à cette hypothèse, nous vérifierons par co-immunoprécipitation les niveaux de PARylation de Lsd1 ou Kdm5a dans le testicule de souris témoins et 0,5% CA, sauvages ou *Tgr5*^{-/-}.

20% des gènes modulés dans le testicule des souris sauvages 0,5% CA sont des ARNs non-codants de type *long non coding RNA*. Ces transcrits sont capables de guider l'action des complexes de modification d'histone en permettant leur recrutement à certaines régions du génome (Keller and Bühler, 2013). Il serait donc envisageable que ces acteurs soient à l'origine de l'augmentation des niveaux d'accumulation testiculaires de la marque H3K4me2 en réponse aux acides biliaires. Ces derniers pourraient titrer l'action des histones déméthylases ou favoriser l'activité des histones méthyltransferases sur des séquences cibles anormalement concernées.

- Pour répondre à cette hypothèse, il est proposé de réaliser une immuno-précipitation des complexes Mll et Lsd1 et de procéder à la quantification voire au séquençage des transcrits qui leurs sont liés.

2.3. Méthylation du génome : les gamètes

Les génomes des spermatozoïdes et des ovocytes sont hautement méthylés. Suite à la fécondation, le développement embryonnaire est marqué par une reprogrammation globale des génomes parentaux. Durant cette phase, l'ADN spermatique est activement déméthylé à l'exception des gènes soumis à empreinte. Le génome des cellules épiblastiques acquiert alors progressivement des profils épigénétiques de différentes natures en lien avec la définition des lignages cellulaires. Une fois déterminées, les cellules germinales primordiales, ou PGCs, subiront une deuxième vague de déméthylation nécessaire au rétablissement de leur caractère totipotent et à l'acquisition d'un nouveau profil épigénétique particulier à la lignée germinale. La quasi totalité des méthylations du génome acquises durant les premières phases de développement, ainsi que celles héritées des génomes parentaux, est retirée. Cette reprogrammation permet entre autre de limiter la transmission d'épimutations par les gamètes (Hajkova et al., 2002). Néanmoins, plusieurs exemples récents suggèrent que certaines régions du génome paternel sont capables d'échapper d'une part au processus d'effacement de la lignée somatique, et d'autre part à la reprogrammation des PGCs (Wei et al., 2014). Elles sont de ce fait responsables de l'héritage transgénérationnel du gamète.

a. Quel est le statut de méthylation du génome des spermatozoïdes ?

L'analyse de données issues d'une approche transcriptomique sur testicule total de mâles sauvages F0, montre que 22 des 130 gènes soumis à empreinte parentale ont tendance à voir leur expression modulée par les acides biliaires (*Fold Change* : 1,4 ; *P value* : 0,05) (Schulz et al., 2008).

Avec des critères d'analyse plus restreints, seul l'accumulation du transcrit *Kcnq1ot1* est diminuée significativement (*Fold Change* : 1,5 ; *P value* : 0,01). De manière intéressante, ce profil est restauré chez les souris *Tgr5*^{-/-}.

L'expression du transcrit *Kcnq1ot1* est sous la dépendance du statut de méthylation de la région du contrôle de l'empreinte parentale *Kv-DMR1*. Dans la lignée germinale mâle, celle-ci est déméthylée ce qui permet le recrutement de la machinerie transcriptionnelle nécessaire à la génération du transcrit *Kcnq1ot1*. Ce dernier permettra à son tour la répression transcriptionnelle de 8 à 10 gènes exprimés uniquement à partir de l'allèle maternel. Certains verront leur expression spécifiquement réprimée dans le placenta (*Osbpl5*, *Tssc4* et *Ascl2*), d'autres le seront dans l'intégralité des tissus du zygote (*Kcnq1*, *Cdkn1c*, *Phlda2* et *Slc22a18*). Chez la souris mâle, l'invalidation du *KvDMR1* entraîne la dé-répression de 6 des 10 gènes soumis à empreinte paternelle parmi lesquels *Cdkn1c* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*). Transmises à la descendance, ces anomalies liées au défaut d'expression de *Kcnq1ot1* dans la lignée germinale mâle, se traduisent par une diminution de près de 25% du poids du corps des embryons comparée à celui de la descendance des mâles sauvages. Ce phénotype sera conservé jusqu'à l'âge adulte (Fitzpatrick et al., 2002).

Ces données bibliographiques font de *Kcnq1ot1* un candidat particulièrement intéressant aux vues des phénotypes F1 et F2 que nous décrivons en réponse aux acides biliaires. Aussi pourrions-nous imaginer que des niveaux de méthylation anormalement élevés de *KvDMR1* puissent contribuer au phénotype transgénérationnel ?

- Nous validerons, par des approches complémentaires de qPCR, la tendance à la diminution des niveaux d'expression testiculaires de *Kcnq1ot1* chez les mâles exposés au régime 0,5% CA.
- Une expérience préliminaire de COBRA (*Combined Bisulfite Restriction Analysis*) ne montre aucune modulation des niveaux de méthylation du *KvDMR1* dans les spermatozoïdes des souris F0 sauvages 0,5% CA. Cette approche devra être complétée par des méthodes d'analyse plus résolutive (meDIP-séq). Elles seront transposées aux spermatozoïdes F1 ainsi qu'aux tissus d'intérêts de souris F1 et F2.

Nous élargirons notre étude à l'analyse des niveaux de méthylation de l'ensemble du génome des gamètes F0 et F1.

- Une approche *meDIP-seq* ou RRBS (*Restrictive representation bisulfite sequencing*) nous permettra d'isoler les territoires génomiques dont les profils de méthylation sont modifiés par le traitement aux acides biliaires.
- Les niveaux de méthylation et d'expression de ces candidats seront suivis dans les tissus d'intérêts des individus F1 et F2 (foie / pancréas).

2.3. Méthylation du génome : retour aux origines F0.

Au cours de la gamétogenèse, les Dnmts sont responsables de l'acquisition et du maintien du profil de méthylation génomique qui sera transmis à la descendance. Nous avons pu mettre en évidence, par une approche qPCR, une augmentation significative des niveaux de *Dnmt3b* dans les extraits de testicule de souris sauvages exposées aux acides biliaires. Celle-ci pourrait être responsable de la mise en place d'une empreinte inadaptée de méthylation.

- L'étude du statut d'expression de *Dnmt3b* chez les souris *Tgr5*^{-/-} permettra de conclure à son implication dans le phénotype F1.

Plusieurs acteurs de la régulation transcriptionnelle de *Dnmt3b* pourraient être à l'origine de la dérégulation de son expression. En réponse à une exposition néonatale à un perturbateur environnemental (*estradiol benzoate*), l'augmentation des niveaux d'expression testiculaires de *miR29* conduit à une diminution des niveaux de transcrits *Dnmt3b* associée à une hypo-méthylation de certaines régions génomiques (Meunier et al., 2012). Dans un scénario qui serait inversé, il sera intéressant d'étudier le statut d'expression de *miR29* à la suite d'une exposition aux acides biliaires.

Outre leur régulation transcriptionnelle, l'action des Dnmt est dépendante de plusieurs acteurs eux-mêmes liés à des événements épigénétiques. La présence de résidus H3K4 méthylés limitent la fixation des protéines du complexe de méthylation *de novo* à l'ADN (Ooi et al., 2007)(Zhang et al., 2010). Nous avons mis en évidence une rétention anormale de la marque H3K4me2 dans le testicule et les spermatozoïdes des souris F0 soumises à un régime supplémenté en acides biliaires. Aussi pourrions-nous nous attendre à une hypométhylation des régions génomiques associées de manière aberrante à H3K4me2. Il sera dans ce sens intéressant de comparer les profils chromatinien (CHIP-séq) et le statut de méthylation de l'ADN (meDIP-séq) des spermatozoïdes F0 et F1.

Plusieurs études démontrent l'implication de Parp1 dans l'établissement et le maintien de l'intégrité de la méthylation du génome. La protéine Ctfc possède une fonction dite insulatrice : elle participe à la régulation de l'expression des gènes contrôlés par l'empreinte parentale. Fixées aux DMRs non méthylés, elle autorise ou restreint l'action des séquences de types *enhancers* et permet l'expression différentielle des gènes selon leur origine parentale. L'action de Ctfc est entre autre déterminée par son statut de PARylation (Jeong and Pfeifer, 2004, Klenova and Ohlsson, 2005 and Yu et al., 2004). Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de Parp-1 est associée à la répression des fonctions de Dnmt1 ce qui conduit à une hypo-méthylation globale du génome (Caiafa et al., 2009).

- Nous analyserons le statut de PARylation de Dnmt1 et Ctfc en réponse aux acides biliaires. Pour ce une expérience de co-immunoprécipitation (résidus PAR – Dnmt1/Ctfc) sera menée à partir des extraits de testicules de souris sauvages ou *Tgr5*^{-/-}, exposés ou non aux acides biliaires.

Au final, la recherche du lien transgénérationnel hérité de la dérégulation du métabolisme des acides biliaires pourraient contribuer à améliorer la compréhension du concept d'hérédité épigénétique paternelle.

Article III

Bile acid exposure reveals Dax-1 as a new target gene of the Farnesol-X-Receptor alpha in the regulation of testicular steroidogenesis in pubertal mice.

Baptissart M, Martinot E, de Haze A, Vega A, Caira F, Schoonjans K, Baron S, Volle DH

En préparation

Bile acid exposure reveals Dax-1 as a new target gene of the Farnesol-X-Receptor alpha in the regulation of testicular steroidogenesis in pubertal mice.

Marine BAPTISSART^{1,2,3,4}, Emmanuelle MARTINOT^{1,2,3,4}, Angélique De HAZE^{1,2,3,4}, Aurélie VEGA^{1,2,3,4},
Françoise CAIRA^{1,2,3,4}, Kristina SCHOONJANS⁵, Silvère BARON^{1,2,3,4} and David H. VOLLE^{1,2,3,4*}

¹INSERM U 1103, Génétique Reproduction et Développement (GReD), BP80026, F-63171 Aubière, France

²Clermont Université, Université Blaise Pascal, GReD, F-63171 Aubière, France

³CNRS, UMR 6293, GReD, F-63171 Aubière, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁵Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Abbreviated title: Bile acids alter pubertal testicular steroidogenesis.

Key terms: Bile acid, Testicular steroidogenesis, FXR α , Dax-1, Germ cell apoptosis, Sexual maturation.

Corresponding authors to whom reprint requests should be addressed: Dr. DH VOLLE, *PhD*. “Génétique Reproduction et Développement”, Inserm U1103, Unité Mixte de Recherche CNRS 6293, Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. e-mail: david.volle@inserm.fr

Abstract. Bile acids play major role on physiology as key actors of the enterohepatic cycle. They also have been defined as signalling molecules through specific receptors such as the nuclear receptor Farnesol-X-Receptor alpha (FXR α) and the G-coupled protein receptor TGR5. Recently bile acid exposure has been demonstrated to impact adult testicular physiology and then fertility. In addition, the use of FXR α synthetic agonist represses testicular steroidogenesis. In order to define the cross-talk between BA-FXR α pathway and testicular steroidogenesis, we exposed male mice during sexual maturation, a time when sexual steroids play major role in physiology. Here we demonstrate that BA exposure during pubertal age led to germ cell apoptosis and delayed germ cell differentiation correlated with altered male fertility as 60% of the exposed males became infertile. In addition, we identified *Dax-1*, a known repressor of steroidogenesis as a direct target gene of FXR α . Our data identify BA-FXR α signaling pathways as critical actors of testicular physiology during sexual maturation *via* the regulation of *Shp* and *Dax-1* expression.

Combined, these data supported the pathophysiological role of BA signaling pathways on testicular physiology at different timing during male life.

Introduction

The two main functions of the testis are the production of male gametes and the secretion of testosterone. Spermatogenesis takes place within seminiferous tubules in association with Sertoli cells, which provide structural and nutritional support for developing germ cells. Coordinated regulation of mitosis, meiosis and apoptosis underpins normal spermatogenesis. In addition, testosterone synthesized by Leydig cells is responsible for testis development, attainment of puberty with the establishment and maintenance of spermatogenesis, maturation of secondary sexual characteristics and then fertility (1).

We showed that adult mice fed a diet supplemented with cholic acid (CA) have altered fertility subsequent to testicular defects and lower sperm count (2). These effects are mediated at testicular level by the bile acid (BA) receptor TGR5 (G-protein coupled bile acid receptor-1, GPBAR1). Even if CA-diet exposure leads to low plasma testosterone levels, we have demonstrated that testicular deleterious effects of BA are not due to such decrease in adult mice. Conversely, the study of a cholestasis model suggests that altered puberty could result from decreased testicular testosterone levels (4). Interestingly, the orphan nuclear receptor Small Heterodimer Partner (SHP, NR0B2), controls testicular androgen synthesis from puberty to adult age. It has to be noticed that *Shp* is a known target gene of the BA receptor FXR α (Farnesol-X-Receptor- α , NR1H4). *In vivo*, the use of a FXR α synthetic agonist, GW4064, validates the efficiency of the FXR α -SHP-testosterone pathway in adult testis (5). Moreover, *in vitro* data suggests a role of FXR α independently of SHP in the control of the *Cytochrome-19a1* gene which is responsible for aromatization of testosterone into estradiol (6). Combined, these data suggest potential interaction between BA signaling pathways and steroid metabolism

during sexual maturation. To define the potential impact of BA signaling in testis, we exposed male mice since weaning to dietary BA. We show that mice fed a diet supplemented with cholic acid (CA-diet) have lower weight gain and altered fertility compare to control group. At testicular level, CA-exposed males show germ cell apoptotic waves associated with delayed germ cell differentiation. These effects were the consequence of lower testosterone synthesis since 5 days after BA-exposure. FXR α repressed the expression of steroidogenic genes in response to BA-diet. As expected, BA-FXR α pathway induced the expression of testicular *Shp*. However, *Shp* invalidation was not sufficient to abolish the impact of BA on germ cell survival. Hence, we pinpoint that the orphan nuclear receptor *Dax-1* (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1, Nr0b1), a known

repressor of steroidogenesis and the “twin” nuclear receptor of SHP (7), is a direct transcriptional target of FXR α . Altogether our data clearly identify BA-FXR α signaling pathways as critical actors of testicular physiology during sexual maturation *via* the regulation of *Shp* and *Dax-1* expression.

Results

Dietary BA supplementation alters male fertility. To identify potential links between pubertal BA exposure and defects of male fertility, mice were fed a normal control diet supplemented with 0.5% of cholic acid (CA). Mice exposed to CA-diet present lower weight gain throughout experiment with significant difference starting 5 days after the beginning of the treatment (**Fig. 1A**). Food intake was not altered (**Fig. 1B**).

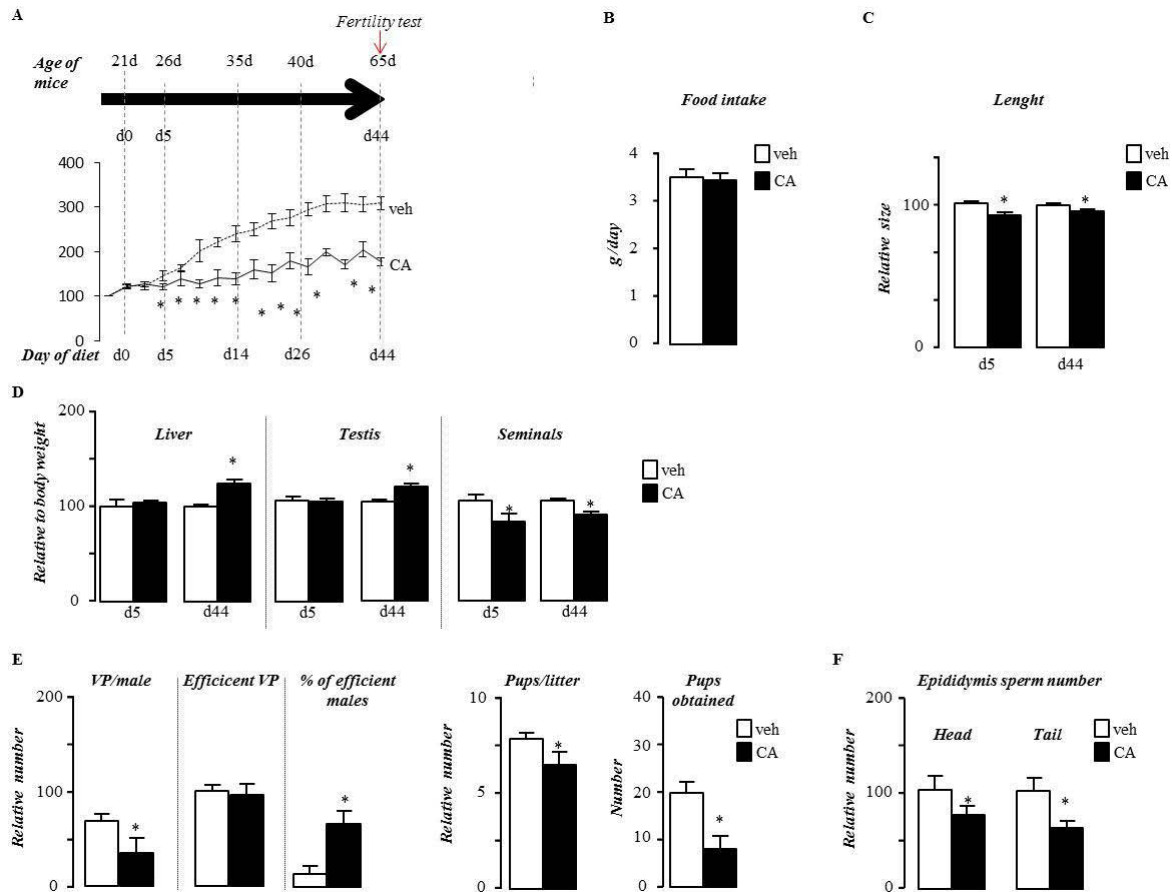


Figure-1. Pubertal exposure to BA alters male fertility. (A) Body weight gain of males exposed to control or CA diets. (B) Mean of daily food intake in control or CA fed groups. (C) Body length of males after 5 or 44 days of either control or CA diet. (D) Liver, testis and seminal weights normalized to body weight in C57Bl/6J mice fed 5 or 44 days of exposure. (E) Each male was bred with 2 C57Bl/6J females to analyze their reproductive capacity with the relative percentage of vaginal plugs (VP) obtained per male; efficiency rate for obtained VP; percentage of infertile males; number of pups per litter; total number of pups obtained per group. (F) Sperm count in the epididymis head and tail of control or CA fed groups. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, $p < 0.05$ vs. control diet group.

CA-exposed males also showed reduced body length (**Fig. 1C**). This difference remained significant after 44-days of exposure to CA-diet (**Fig. 1C**). Liver injury was validated with the increased of liver weight since 14 days of diet (**Fig. 1D**) as well as modification of mRNA accumulation of genes involved in detoxification such as *Cyp3a25* and *Sult2a1* (**Suppl.1A**). CA-diet exposure affect male libido, as measured by the number of vaginal plugs obtained per male (**Fig. 1E**). Validated plugs gave the same rate of pregnancy (**Fig. 1E**). CA-diet led to altered fertility with 60% of the exposed males unable to give progeny (**Fig. 1E**). In males giving progenies, CA-diet also decreased (20%) the number of pups per litter (**Fig. 1E**). The combination of the increase of sterile males and decrease of pups per litter resulted in a 60% decrease of the number of pups generated by CA-

exposed males compare to control-diet group (**Fig. 1E**). This decreased fertility was associated with a lower production of spermatozoa as revealed by the counting of sperm number in the epididymis head and tail (**Fig. 1F**).

Pubertal BA-exposure alters germ cell survival.

Histological analyses of testis showed that BA-exposed mice had a decrease in the number of seminiferous tubules with elongated spermatid cells at 14 and 44-days after CA-diet exposure (**Fig. 2A & 2B**). This was associated with a lower expression of *Prm2*, a specific gene of post-meiotic cells (**Fig. 2C**). This delay in germ cell differentiation was correlated with an early apoptotic wave of germ cells after 5-days of CA-diet (**Fig. 2D & 2E**); which is observed for spermatogonia and spermatocytes.

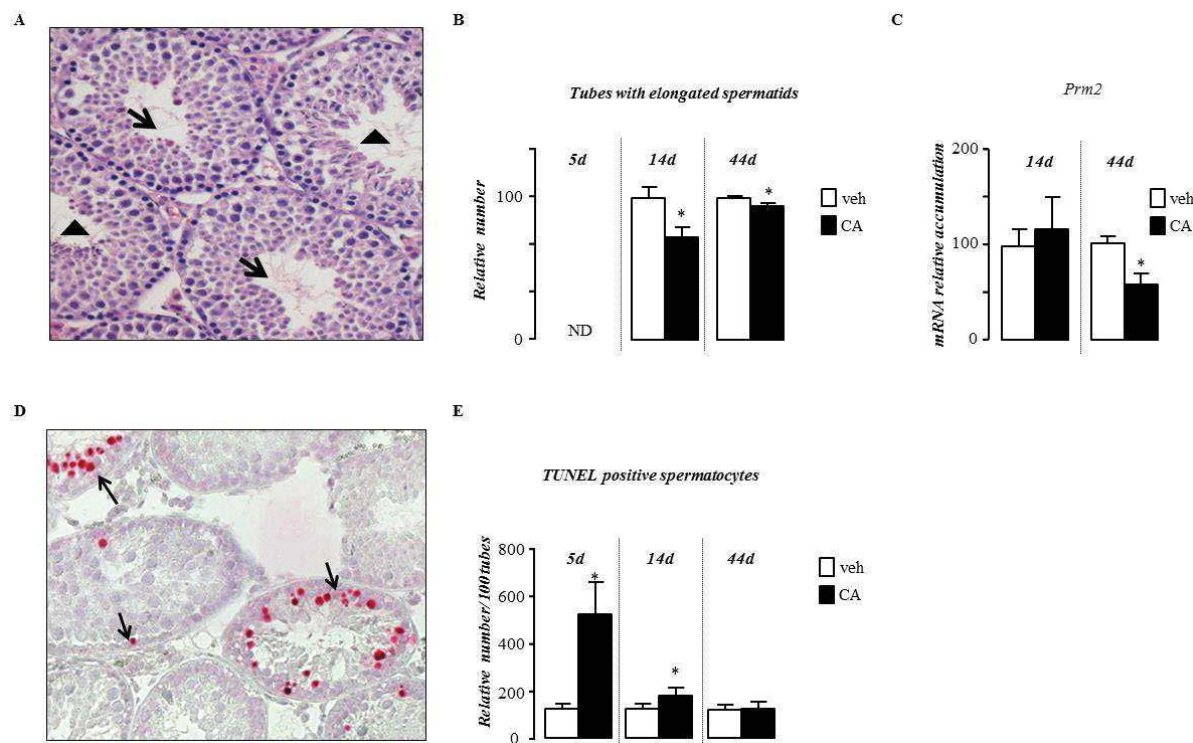


Figure-2. Pubertal BA-exposure alters germ cell survival. (A) Representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained testes of mice fed CA-diet for 14 days. The arrow-head indicates tubules with elongated spermatids; arrows indicate tubes without elongated spermatids. The original magnification was x200. (B) Quantification of the number of tubules with elongated spermatids per 100 seminiferous tubules after 14 and 44 days of control or CA-diet (n=10-20 per group). (C) Testicular mRNA expression of *Prm2* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 14 or 44 days (n=10 to 15 per group). (D) Apoptosis in mice exposed to control or CA diets (n=10-20 per group) analyzed by TUNEL staining. Representative micrographs of testis exposed to control or CA diets for 5 days. The arrows indicate apoptotic spermatocytes. The original magnification was x200. (E) Quantification of TUNEL analyses after 5, 14 or 44 days of diet exposure. The number of TUNEL-positive is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=10-20). Control diet treated mice were arbitrarily fixed at 100%. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, $p < 0.05$ vs. control diet group.

This apoptotic wave was transient as at 26-days after the beginning of the treatment no more difference was observed between CA-diet and control-diet groups (**Fig. 2E & data not shown**).

BA-diet induces germ cell death via alteration of testosterone metabolism. Germ cell death has previously been associated with androgen withdrawal (8). In contrast to adult CA-exposure (2), the juvenile exposure did not led to altered plasma testosterone levels (data not shown). Interestingly, CA-exposed males showed a transient decrease of intra-testicular levels of testosterone (**Fig. 3A**). This was associated with a decrease of *luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor* (*Lhcgr*) and the *Steroidogenic Acute Regulatory protein* (*Star*)

mRNA accumulations in testis of CA-exposed mice compare to control group (**Fig. 3B**). The involvement of testosterone decrease in germ cell death was sustained by the fact that supplementation with testosterone counteracted the effect of BA-diet on germ cell apoptosis (**Fig. 3C**). In order to decipher if testosterone impacted *per se* germ cell physiology or if it could act *via* its aromatization into estradiol, we studied the estrogenic signaling pathways, which are known regulators of steroidogenesis in Leydig cells (9), (10). Intra-testicular levels of estradiol were not affected by CA-diet after 5-days of exposure (**Fig. 3D**), a time where germ cell apoptosis was seen. We next analyzed the expression of the two estrogen receptors described in Leydig cells, the G protein receptor *Gpr30* and the nuclear

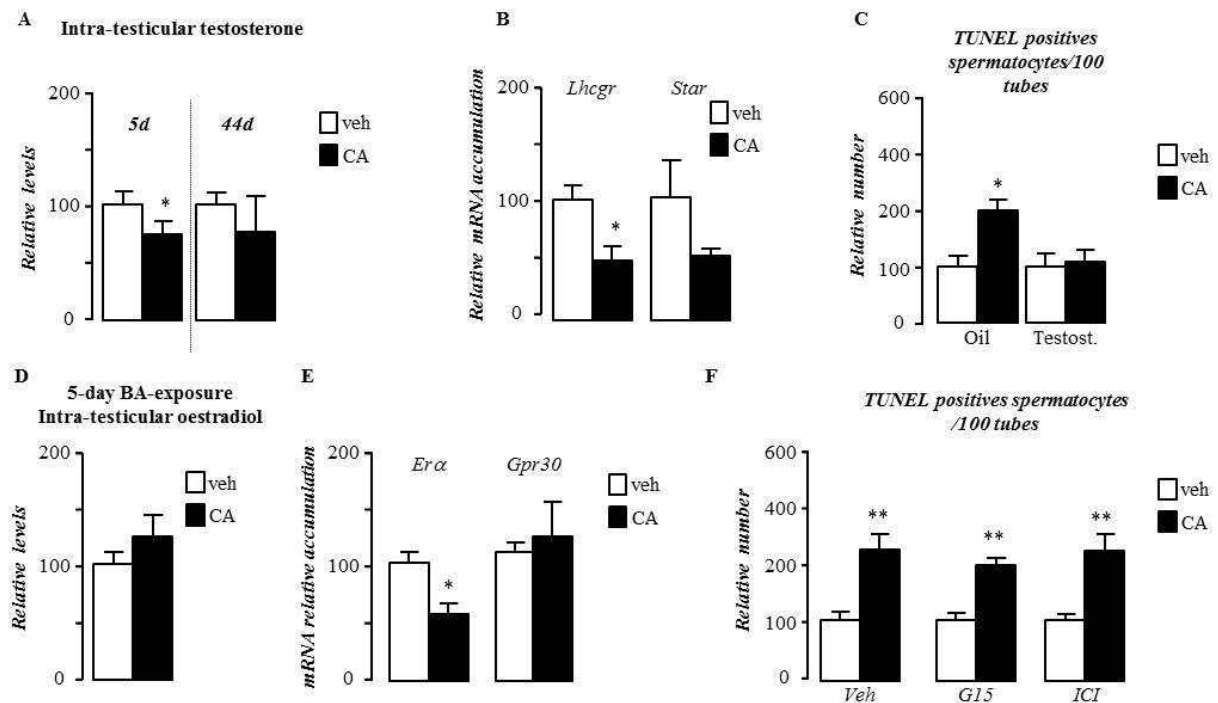


Figure-3. Pubertal BA exposure regulates testicular androgen metabolism. (A) Relative intra-testicular testosterone levels in C57Bl/6J mice fed control or CA diet for 5 or 44 days (n=6-20 per group). (B) Testicular mRNA expression of *Lhcgr* and *Star* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 5 days (n=10 to 15 per group). (C) Quantification of TUNEL analyses after testosterone or vehicle treatment in males fed control or CA diets for 5 days. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=10-20). (D) Relative intra-testicular estradiol levels in C57Bl/6J mice fed 5 days a control or CA diets (n=6-20 per group). (E) Testicular mRNA expression of *Era* and *Gpr30* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 5 days (n=10 to 15 per group). (F) Quantification of TUNEL analyses after vehicle, G15 or ICI treatment in male fed 5 days with control or CA diets. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=10-20). In all panels control diet treated mice were arbitrarily fixed at 100% and data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05 vs. control diet group.

receptor estrogen receptor alpha (*Era*). If the expression of *Gpr30* was not altered, the CA-

exposed males showed a lower level of *Era* compared to control group (**Fig. 3E**). This impact

on $Er\alpha$ expression was supported by the altered expression of testicular $Er\alpha$ target genes such as Renin-1 (Suppl. 1B). These results suggest that estrogenic pathway must be increased in the context of CA-diet. In order to discriminate its involvement in CA-induced germ cell apoptosis, we used specific antagonists of GPR30 or $Er\alpha$, respectively G15 (11) and ICI 182, 780 (12). None of these antagonists was able to counteract the effect of CA on germ cell death (Fig. 3F).

BA-diet alters germ cell survival in part via a SHP-independent manner. As SHP has been demonstrated as the molecular link between FXR α signaling and steroidogenesis (5), we studied its role in the testicular phenotype during juvenile cholestasis. Surprisingly, $Shp^{-/-}$ males exposed to BA-diet showed altered fertility (data

not shown). In addition, as in wild-type, a lower testosterone level (Fig. 4A) was associated with an increased germ cell apoptosis in $Shp^{-/-}$ males (Fig. 4B). This suggests that during puberty, BAs can repress testicular steroidogenesis in a SHP-independent manner.

BAs alter testis physiology through FXR α in pubertal mice. In order to determine which BA-receptor is involved, experiments were performed using FXR α synthetic agonist, GW4064, or exposure of $Tgr5^{-/-}$ mice to CA-diet. Our data clearly demonstrate that TGR5 was not involved in the phenotype as $Tgr5^{-/-}$ mice showed higher apoptotic germ cell (Suppl. 1C) in response to CA-diet, i.e. the same phenotype than the one previously observed.

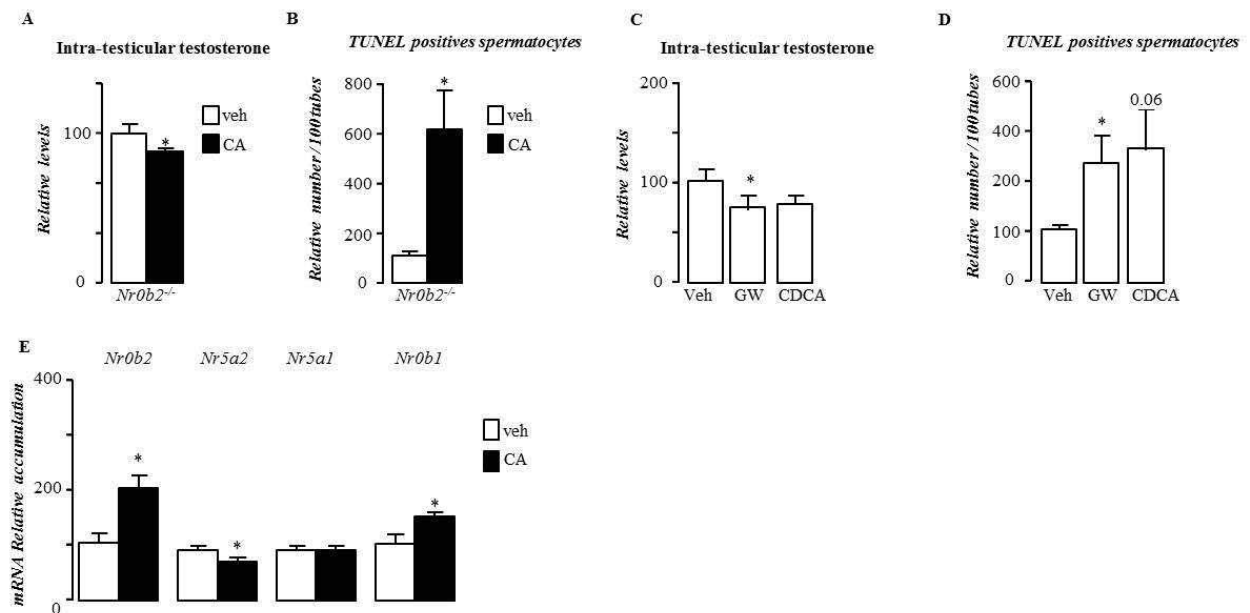


Figure-4. FXR α signaling pathway is functional *in vivo* in pubertal male. (A) Relative intra-testicular testosterone levels in $Shp^{-/-}$ mice fed control or CA diet for 5 days (n=5-6 per group). (B) Quantification of the TUNEL analyses in $Shp^{-/-}$ male fed 5 days with control or CA diets. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=5-6). (C) Relative intra-testicular testosterone levels in C57Bl/6J mice treated 5 days with vehicle, GW4064 or CDCA (n=5-6 per group). (D) Quantification of TUNEL analyses in male mice treated with vehicle, GW4064 or CDCA for 5 days. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=5-6). (E) Testicular mRNA expression of $Nr0b2$, $Nr5a2$, $Nr5a1$ and $Nr0b1$ normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 5 days (n=5 to 6 per group). In all panels control diet or vehicle treated mice were arbitrarily fixed at 100% and data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, $p < 0.05$ vs. control diet group.

In contrast, the treatment with GW4064 during 5 days repressed testosterone synthesis (Fig. 4C) and led to an increase of germ cell apoptosis (Fig. 4D). A similar profile was observed with chenodeoxycholic acid (CDCA) a natural ligand

of FXR α (Fig. 4D).

At the molecular level, wild-type males fed CA-diet showed a lower level of $Lrh-1$ mRNA, a known inducer of steroidogenic gene (Fig. 4E). Consistent with previous study, these effects of

CA-diet were associated with an increase of *Shp* mRNA levels (**Fig. 4E**). As *Shp* deficiency was not sufficient to reverse the impact of BA exposure on testosterone synthesis (**Fig. 4A**), we wondered whether other repressor of steroidogenesis could be involved. We focused on DAX-1 which is closely related to SHP. Interestingly, 5-days of CA exposure resulted in a higher testicular mRNA accumulation of *Dax-1* (**Fig. 4E**).

Dax-1 mediates part of the negative effect of BA signaling pathway on testicular steroidogenesis. In order to validate if *Dax-1* is a *bona fide* target gene of FXR α , we used GW4064 the well described synthetic agonist of FXR α . Consistently with previous report (5), our data confirmed that *Shp* mRNA accumulation was increased by GW4064 after 12 hours but not at 24 hours (**Suppl. 1D**). It resulted in an increased of testicular mRNA accumulation of *Dax-1* since 24 hours after treatment (**Fig. 5A**). This effect was maintained after 5-days of exposure to GW4064 (**Fig. 5A**). In addition treatment of MA10 cells with GW4064 showed

similar increased of *Dax1* mRNA accumulation (**Fig. 5B**). *In silico* analysis of 5'-sequences of the *Dax-1* mouse and human genes revealed a putative FXRE sequence (IR1) (**Suppl. 1E**). Ability of FXR α to transactivate the promoter of *hDAX-1* was assessed. Ectopic expression of RXR/FXR α by transient transfection elicited 1.2kb-*hDAX-1* promoter activity in a ligand-dependent manner as shown by the use of RXR ligand (LG268), GW4064 or combination of both ligands (**Fig. 5C**). Direct interaction of the RXR/FXR α heterodimer with the FXRE was confirmed by electromobility shift assays (**Fig. 5C**). A significant band shift was observed when both FXR α and RXR were added, which was specifically competed away by a 200-fold molar excess of the unlabeled consensus IR1 (*FGF19* gene (13)) sequence; whereas nonspecific sequence (LXRE *abca1* (14)) did not compete the binding of the heterodimer. Specificity of this interaction was supported by the ability of an antibody directed against hFXR α to abolish heterodimer binding (**Fig. 5D**).

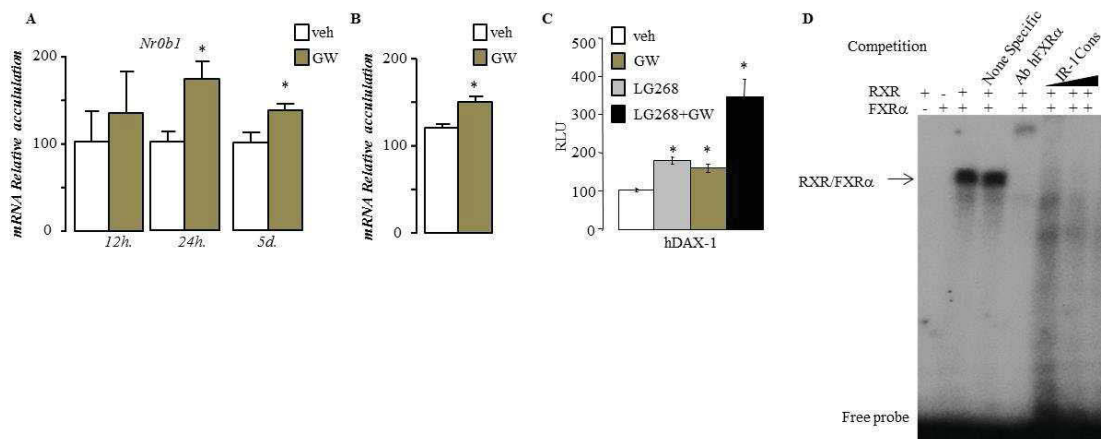


Figure-5. FXR α represses testicular steroidogenesis via Dax-1 regulation. (A) Testicular mRNA expression of *Nr0b1* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice treated with GW4064 for 12h, 24h or 5 days (n=5 per group). (B) mRNA expression of *Nr0b1* normalized to β -actin levels in MA10 cells treated with veh or GW for 16hrs (n=3 per group). (C) CV1 cells were transfected with CMX-mFXR α , CMX-mRXR α , or both receptor plasmids in the presence of the 1.2kbDAX-1 promoter (*hDAX1*) linked to luciferase. Cells were treated with GW4064 (1 μ M) and/or LG268 (0.1 μ M). (D) Electromobility shift assays were performed with [32 P]-labeled FXRE and *in vitro*-transcribed hFXR α and/or human RXR α . Competitions were performed using unlabeled nucleotides at 200-fold molar excess of IR1-*hFGF19* or a none-specific sequence (LXRE *abca1*). For antibody-binding reactions, hFXR α -specific antibody was included. In all of the panels vehicle treated cells were arbitrarily fixed at 100% and data are expressed as means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05 vs. control diet group; n=6-10 per group.

Discussion.

We have recently demonstrated that exposure to dietary BA induces male infertility. This is associated with alteration of testicular physiology mainly mediated by the BA receptor TGR5 (2). These results were unexpected as we had

previously demonstrated that FXR α is mainly expressed in interstitial compartment of adult testis and that it induced short term repression of steroidogenesis *via* regulation of *Shp* expression (5).

In order to explore the impact of BA on testicular

steroid synthesis, we exposed male mice during sexual maturation, a timing where sexual steroids play major roles. In this work, we point out that BA alters testicular physiology during sexual maturation mainly through their impact on steroidogenesis. Moreover, we provide evidence for the critical roles played by the FXR α -SHP/DAX1 signaling pathways in the regulation of male reproductive functions.

The present study suggests that BA signaling pathways involved might be different to those involved in adult male mice (2). However, it has to be noticed that the short term impact of BA-diet on steroidogenesis had not been fully studied in adult mice. Thus it cannot not be excluded that such phenomena also happens in adult mice. It is interesting to note that for other kinds of exposure, such as for endocrine disrupters, the window of exposure is critical in regards of the observed phenotypes. Indeed, *in utero*/neonatal exposure leads to infertility (12) whereas adult exposure is associated with transitory germ cell apoptosis (15).

The idea of close links between FXR α signaling pathways and steroid metabolisms is thus reinforced (16). Indeed, FXR α participates in steroid catabolism in liver and interferes with the steroid signaling pathways in target tissues *via* a crosstalk with glucocorticoid or estrogen receptors. Surprisingly, in adrenals (17) and testis (the present study and (5)), FXR α has opposite effects on steroid synthesis.

If we previously identified that acute exposure to FXR α agonist represses testosterone synthesis *via* SHP, the present work suggest that in longer exposure (5-days), FXR α could repress steroidogenesis in a SHP-independent manner. This is explained by our results demonstrating for the first time that *Dax-1* is a direct transcriptional target gene of FXR α . This regulation should be of importance as DAX-1 acts as a co-repressor of FXR α through the competition with co-activators such as SRC-1 and PGC-1 α (18). Combined these data suggest the existence of a potential negative feedback for a local control of steroidogenesis. This also opens new interesting field of research as *Dax-1* expression has been associated with altered reproductive function. BA-diet led to repression of *Lhcgr* expression. This suggests that BA signaling pathway could, at the testicular levels, interact with the hypothalamo-pituitary axis in the regulation of testosterone production. We added here a new level in the crosstalk between BA signaling pathways and the HP axis as the two main targets of FXR α , in the repression of steroids synthesis,

namely *Shp* and *Dax-1* have been shown to be negatively regulated by the LH pathways (19), (20).

The remaining question, which will require additional studies, will be to clearly decipher the physiological role of FXR α and BA with Leydig cells. We need to determine in which conditions the FXR α signaling pathway participates to the repression of Leydig steroidogenesis. Several hypotheses could be made, however the first point will be to define the endogenous ligand of FXR α within the testis. We have demonstrated that BA are present in the testis in “normal” conditions (2), we still have to define their origin, either from liver or local testicular synthesis. Indeed, it has been demonstrated that ovary produces bile acids (21). In addition, others define that steroids derived from androgen catabolism like androstenedione are potential FXR α ligands (22), what could lead a testicular feedback loop to repress androgen production (23). Combined these data suggest that FXR α could be activated by numerous stimuli within the testis.

Our data clearly define FXR α as an important actor of the regulation of testicular steroidogenesis. This is in accordance with experimental data showing that during pubertal life, cholestasis alter testicular physiology *via* impacts on testicular steroid synthesis (4). Combined, these data supported the physiological role of BA signaling pathways on testicular physiology at different timing during male life.

Material & Methods

Ethics Statement. This study was conducted in accordance with the current regulations and standards approved by the Animal Care Committee (CEMEA Auvergne).

Animals. C57Bl/6J were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France); *Shp*^{-/-} and *Tgr5*^{-/-} mice have been previously described (12), (18). The mice used in this study were maintained on a C57BL/6J background and housed in temperature-controlled rooms with 12 hours light/dark cycles. Mice had *ad libitum* access to food and water. 21-days old mice were fed to D04 diet (control) or D04 diet supplemented with 0.5% cholic acid (CA-diet) (SAFE, Augy, France) for 5, 14, 26 or 44 days. As young mice are quite sensitive to CA-diet, they were fed 5 days CA-diet and 2 following days the control diet. This sequence was repeated until sacrifice.

Histology. Testes were collected,

paraformaldehyde (PFA)-fixed and embedded in paraffin, and 5 µm-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin.

TUNEL analysis. TUNEL experiments were performed as previously described on 5 µm of testis fixed in PFA 4% (8). In each testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted. Results are expressed as the number of tubules with either spermatocytes or spermatids TUNEL-positive per 100 seminiferous tubules.

Endocrine Investigations. Steroids were extracted from testes as previously described (8). Intra-testicular and plasma levels were measured using commercial kits: testosterone and estradiol (Diagnostic Biochem, London, Canada).

Real-Time RT-PCR. RNA from testis samples were isolated using Nucleospin RNA (Macherey-nagel, Hoerd, France). cDNA were synthesized from total RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnière Les Bains, France). Real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France) to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. Sequences of primers are reported in Suppl. Table. Standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. Results were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Cotransfection assays. CV1 cells were transfected as described (14). hDAX-1 promoter-luciferase reporter (25) was kindly provided by Dr E. Lalli. h-DAX-1-luc construct (50 ng) was added in combination with CMX-mFXR α (15 ng), CMX-mRXR α (15 ng), β -galactosidase (10 ng), and pGEM for a total of 150 ng/well. Ligands were added 6–8 hours later in delipidated media. Cells were harvested 14–16 hours later and assayed for luciferase and β -galactosidase activity. Luciferase values were normalized for transfection efficiency using β -galactosidase and expressed as RLU of triplicate assays (mean \pm SD).

Cell culture experiments. MA10 cells were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ with Waymouth (Life Technologies) containing 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin supplemented with 10% horse serum. On d0, MA10 cells were seeded at 400 \times 10³ cells per well in 6-well plates and allowed to adhere overnight. The following day, cells were washed twice with 1 \times PBS, and the medium without serum was applied with the GW4064 (10⁻⁶M) or vehicle (DMSO).

Electrophoretic mobility shift assays. EMSAs were performed as previously described (14). Experiments were done *in vitro* translated proteins for FXR α and RXR using the appropriate labeled probe (IR1-hDAX1:5'-CCGCGCCCTTGCCCAGACCGAGGCG-3'). Specificity RXR-FXR of binding was tested by competition with \times 100, \times 50, and \times 20 excess of various unlabeled FXREs (IR1-hFGF19 (13)) or LXRE (LXRE-abca1 (25)); or by supershift using a FXR α -specific antibody (PP-A9033A-00, Perseus Proteomics Inc., Japan). After electrophoresis, gel was dried at 80°C for 1 h and autoradiographed with intensifying screen at -80°C overnight.

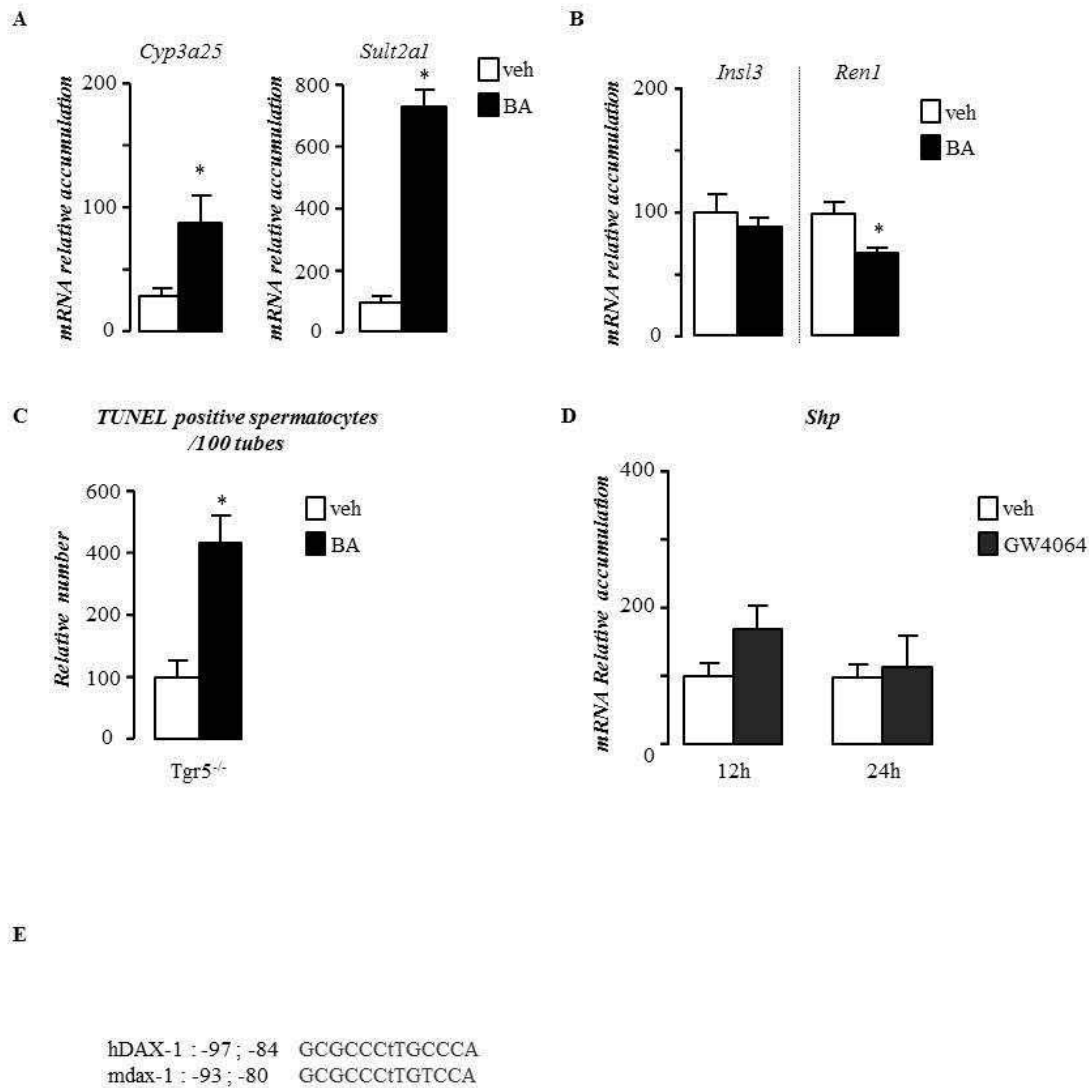
Acknowledgements: This work was funded by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to MB), Swiss National Science Foundation (to KS), Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme to DHV), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to DHV), and ANR Jeune Chercheur (#1103 to DHV).

References

1. **Wilson JD, Leihy MW, Shaw G, Renfree MB.** Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2002;198(1-2):1–5.
2. **Baptissart M, Vega A, Martinot E, Pommier AJ, Houten SM, Marceau G, Haze A de, Baron S, Schoonjans K, Lobaccaro J-MA, Volle DH.** Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology* 2014;60(3):1054–1065.
3. **Baptissart M, Vega A, Martinot E, Pommier A, Houten S, Mareceau G, De Haze A, Baron S, Schoonjans K, Lobaccaro JM, Volle D.** TGR5 signaling pathways initiate fertility disorders during liver diseases. *Hepatology* 2014;. doi: 10.1002/hep.27204.
4. **Van Thiel DH, Gavalier JS, Zajko AB, Cobb CF.** Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1985;4(4):616–621.

5. **Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro J-MA, Verhoeven G, Schoonjans K, Auwerx J.** The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* 2007;21(3):303–315.
6. **Catalano S, Malivindi R, Giordano C, Gu G, Panza S, Bonofiglio D, Lanzino M, Sisci D, Panno ML, Andò S.** Farnesoid X Receptor, through the Binding with Steroidogenic Factor 1-responsive Element, Inhibits Aromatase Expression in Tumor Leydig Cells. *J. Biol. Chem.* 2010;285(8):5581–5593.
7. **Ehrlund A, Treuter E.** Ligand-independent actions of the orphan receptors/corepressors DAX-1 and SHP in metabolism, reproduction and disease. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2012;130(3-5):169–179.
8. **Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, Siddeek B, Déchelotte P, Sion B, Veyssière G, Benahmed M, Lobaccaro J-MA.** Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol.* 2007;21(5):1014–1027.
9. **Delbès G, Levacher C, Duquenne C, Racine C, Pakarinen P, Habert R.** Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 2005;146(5):2454–2461.
10. **Vaucher L, Funaro MG, Mehta A, Mielnik A, Bolyakov A, Prossnitz ER, Schlegel PN, Paduch DA.** Activation of GPER-1 estradiol receptor downregulates production of testosterone in isolated rat Leydig cells and adult human testis. *PLoS ONE* 2014;9(4):e92425.
11. **Burnett LA, Light MM, Mehrotra P, Nowak RA.** Stimulation of GPR30 Increases Release of EMMPRIN-Containing Microvesicles in Human Uterine Epithelial Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;97(12):4613–4622.
12. **Volle DH, Decourteix M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, McNeilly AS, Schoonjans K, Benahmed M.** The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* 2009;119(12):3752–3764.
13. **Holt JA, Luo G, Billin AN, Bisi J, McNeill YY, Kozarsky KF, Donahee M, Wang DY, Mansfield TA, Klier SA, Goodwin B, Jones SA.** Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 2003;17(13):1581–1591.
14. **Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veyssière G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro J-MA.** Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol. Endocrinol.* 2004;18(4):888–898.
15. **Omezzine A, Chater S, Mauduit C, Florin A, Tabone E, Chuzel F, Bars R, Benahmed M.** Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. *Endocrinology* 2003;144(2):648–661.
16. **Baptissart M, Vega A, Martinot E, Baron S, Lobaccaro J-MA, Volle DH.** Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. doi:10.1007/s00018-013-1387-0.
17. **Hoekstra M, van der Sluis RJ, Li Z, Oosterveer MH, Groen AK, Van Berkel TJC.** FXR agonist GW4064 increases plasma glucocorticoid levels in C57BL/6 mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012;362(1-2):69–75.
18. **Li J, Lu Y, Liu R, Xiong X, Zhang Z, Zhang X, Ning G, Li X.** DAX1 suppresses FXR transactivity as a novel co-repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011;412(4):660–666.
19. **Vega A, Martinot E, Baptissart M, De**

- Haze A, Saru J, Baron S, Caira F, Schoonjans K, Lobaccaro J, Volle D.** Identification of the link between the hypothalamo-pituitary axis and the testicular orphan nuclear receptor NR0B2 in male mice. *Endocrinology*. 2014:Submitted.
20. **Manna PR, Chandrala SP, Jo Y, Stocco DM.** cAMP-independent signaling regulates steroidogenesis in mouse Leydig cells in the absence of StAR phosphorylation. *J. Mol. Endocrinol.* 2006;37(1):81–95.
 21. **Smith LP, Nierstenhoefer M, Yoo SW, Penzias AS, Tobiasch E, Usheva A.** The bile acid synthesis pathway is present and functional in the human ovary. *PLoS ONE* 2009;4(10):e7333.
 22. **Howard WR, Pospisil JA, Njolito E, Noonan DJ.** Catabolites of Cholesterol Synthesis Pathways and Forskolin as Activators of the Farnesoid X-Activated Nuclear Receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2000;163(2):195–202.
 23. **Wang S, Lai K, Moy FJ, Bhat A, Hartman HB, Evans MJ.** The Nuclear Hormone Receptor Farnesoid X Receptor (FXR) Is Activated by Androsterone. *Endocrinology* 2006;147(9):4025–4033.
 24. **Pols TWH, Nomura M, Harach T, Lo Sasso G, Oosterveer MH, Thomas C, Rizzo G, Gioiello A, Adorini L, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K.** TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading. *Cell Metab.* 2011;14(6):747–757.
 25. **García-Aragoncillo E, Carrillo J, Lalli E, Agra N, Gómez-López G, Pestaña A, Alonso J.** DAX1, a direct target of EWS/FLI1 oncoprotein, is a principal regulator of cell-cycle progression in Ewing's tumor cells. *Oncogene* 2008;27(46):6034–6043.



Supplemental 1. (A) Testicular mRNA expression of *Cyp3a25* and *Sult2a1* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 14 or 44 days (n=5 to 6 per group). (B) Testicular mRNA expression of *Insulin-like 3 (Ins13)* and *Renin-1 (Ren1)* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice fed control or CA diets for 14 or 44 days (n=5 to 6 per group). (C) Quantification of the TUNEL analyses in *Tgr5*^{-/-} male fed 5 days with control or BA diets. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules (n=5-6). (D) Testicular mRNA expression of *Shp* normalized to β -actin levels in whole testis of C57Bl/6J mice treated 12 hours or 24 hours with GW4064 (n=5 to 6 per group). (E) Sequences of FXRE putative binding site (IR1) in human and mouse DAX-1 promoters. In all of the panels Control diet or vehicle treated mice were arbitrarily fixed at 100% and data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *, p<0.05 vs. control diet group; n=6-10 per group.

Supplemental Table. Q-PCR Primers list.

Actine	FW	TCATCACTATTGGCAACGAGC
	Rev	AGTTTCATGGATGCCACAGG
Lhcgr	FW	AGCTAATGCCTTTGACAACC
	Rev	GATGGACTCATTATTCATCC
Star	FW	TGTCAAGGAGATCAAGGTCCTG
	Rev	CGATAGGACCTGGTTGATGAT
Nr0b2	FW	CTTTCTGGAGCCTTGAGCTGG
	Rev	GTTGAAGAGGATCGTGCCCTT
Nr5a1	FW	TGCAGAATGGCCGACCAG
	Rev	TGGCGGTAGATGTGGTC
Nr5a2	FW	CTCTTGATTCTCGATCACATTTACC
	Rev	CCAGGAACTTGAGACATACAAACTC
Nr0b1	FW	TGCACTTCGAGATGATGGAG
	Rev	ATCTGCTGGGTTCTCCACTG
Prm2	FW	CCAGTGAGGGTCAGCACCAG
	Rev	TCTGCAGCCTCTGCGATGCC

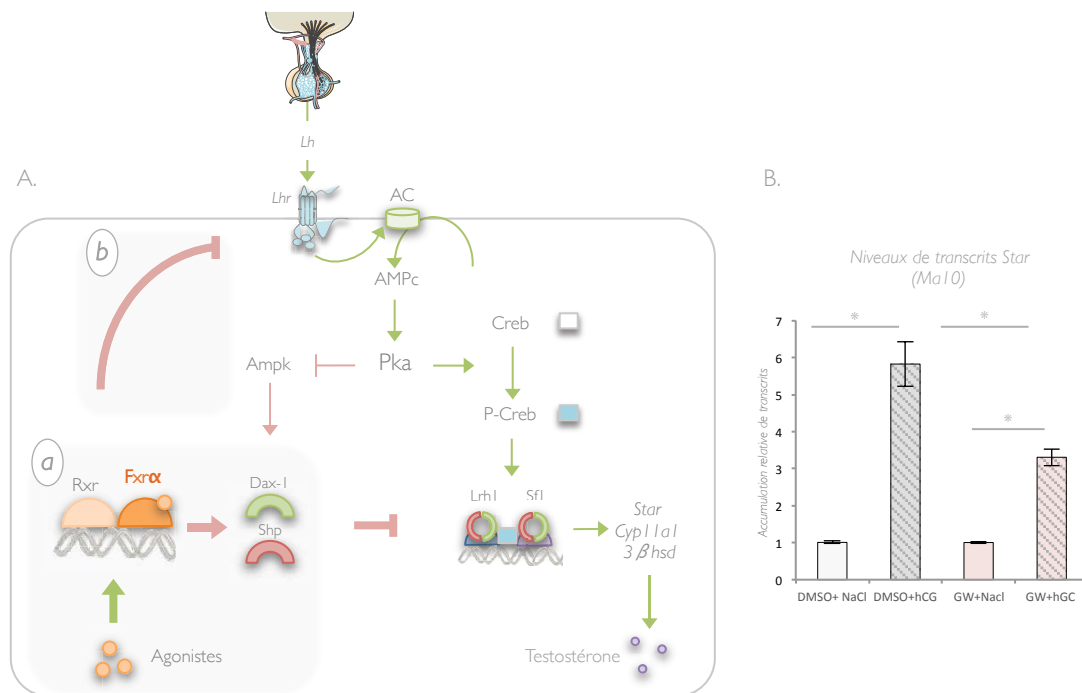


Figure 34. Fxrα, Shp, Dax-1 : plateforme clef de la régulation de la stéroïdogénèse Leydigienne.

A. L'action de la Lh pour l'induction de la stéroïdogénèse Leydigienne met en jeu deux voies de signalisations parallèles. L'activation du récepteur Lhr conduit à l'activation de la voie canonique Lh/Lhr/AMPc/Pka/Creb/P-Creb et à l'induction de l'expression des enzymes Star, Cyp11a1, 3βhsd. En parallèle, la répression de la l'Ampk par la Pka permet de lever l'action répressive des récepteurs nucléaires orphelins Shp et Dax-1 sur la transcription des enzymes stéroïdogènes (Vega et al., 2014 ; Song et al., 2014). **a.** Dans la cellule de Leydig, Shp et Dax-1 sont des cibles transcriptionnelles directes de Fxrα (Article III ; Volle et al., 2007). **b.** L'activation de Fxrα réprime les niveaux de transcrits Lhr (données préliminaires). Dans ce contexte, nous posons l'hypothèse que l'activation de Fxrα puisse s'opposer au contrôle de la stéroïdogénèse par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. **B.** Le prétraitement par le GW4064 (ligand Fxrα) d'une lignée murine de cellules de Leydig (Ma10) réduit l'induction des niveaux de transcrits Star consécutifs à un traitement par hCG. (n=15) ; * p> 0,05

Fxrα, Farnesoid x receptor alpha ; Rxr, Retinoid x receptor ; Shp, Short heterodimer partner ; Lrh1, Liver receptor homolog-1 ; Sf1, Steroidogenic factor 1 ; Star, Steroidogenic Acute Regulatory protein ; Cyp11a1 (P450scc), cytochrome P450 side chain cleavage ; 3βhsd, 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase ; Pka, protéine kinase A ; Creb, cAMP responsive element binding protein ; AMPc, adenosine monophosphate cyclic ; Lh, luteinizing hormone ; Lhr, luteinizing hormone receptor ; Dax-1, dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 ; Ac, adenylate cyclase

Discussion et perspectives, Article III

Les données de la littérature montrent le rôle central de $Fxr\alpha$ vis-à-vis de l'homéostasie des hormones stéroïdiennes (revue en annexe de ce manuscrit ; Baptissart et al., 2013). Nos travaux permettent pour la première fois d'intégrer ces données à la physiopathologie cholestatique.

Chez l'adulte, nous avons montré qu'un régime supplémenté en acide cholique conduit à la répression des enzymes stéroïdogènes dans le testicule (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*). Celle-ci n'est cependant pas suffisante pour affecter l'activité de synthèse des androgènes et les concentrations de testostérone testiculaires sont préservées. Parallèlement, nous montrons une diminution des concentrations plasmatiques de testostérone. L'hypothèse d'une augmentation du catabolisme périphérique de la testostérone est favorisée et reste à confirmer.

Mais qu'en est-il lors de la puberté ?

La puberté correspond à l'activation de la fonction hypothalamo-hypophyso-gonadique aboutissant, sous l'influence des androgènes, au développement complet des caractères sexuels, à l'acquisition de la taille définitive, de la fonction de reproduction et de la fertilité. Cette fenêtre d'exposition est donc particulièrement sensible aux perturbations endocriniennes.

Nous montrons que des souris mâles de 21 jours exposées à un régime acide cholique présentent un défaut de croissance staturo-pondérale ainsi qu'un retard de mise en place des fonctions de reproduction conduisant, à l'âge adulte, à une hypofertilité. Au niveau testiculaire, le traitement se traduit par une spermatogenèse retardée ; son origine est liée à une apoptose transitoire de la lignée germinale associée à une hypo-androgénie testiculaire.

Dans ce contexte, nos données définissent pour la première fois *Dax-1*, répresseur connu de l'expression des enzymes stéroïdogènes, comme un gène cible direct de $Fxr\alpha$ dans les cellules de Leydig. Tandis que des travaux précédents montraient *Shp* nécessaire à la répression de la stéroïdogénèse à court terme, notre modèle montre une voie alternative par laquelle $Fxr\alpha$, à plus long terme, interfère avec la production des androgènes testiculaires en réponse à des concentrations pathologiques d'acides biliaires.

1. $Fxr\alpha$, *Shp* et *Dax-1* : bien plus qu'une régulation « locale »

Des données récentes de l'équipe (*en cours de publication*) et les travaux de Song *et al.* montrent que *Shp* et *Dax-1* ne font pas seulement l'objet d'une régulation locale mais que l'axe hypothalamo-hypophysaire est capable d'en moduler l'expression (Figure 34 a) (Vega *et al.* 2014 ; Song et al., 2004) ; *in vivo*, l'élévation des concentrations de Lh se traduit par une diminution de l'expression testiculaire de *Shp* et *Dax-1*. La Lh mène donc une double action pour favoriser la

stéroïdogénèse : 1) elle permet *via* la voie canonique Lh/Lhr/AMPC/Pka/Creb d'induire l'expression des enzymes stéroïdogènes ; 2) en parallèle, elle permet de lever l'action répressive de Shp et Dax-1 sur la transcription des enzymes stéroïdogènes.

L'ensemble de ces données définit Shp et Dax-1 comme une plateforme clef de la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. La puberté est initiée par une augmentation en fréquence et en amplitude des pics de Lh contribuant à l'élévation de la production des androgènes associée à la maturation des fonctions de reproduction. Ces observations conduisent à se poser les questions suivantes :

L'induction de Fxr α vient-elle s'opposer, par l'intermédiaire de Shp et/ou Dax-1, à la stimulation de la stéroïdogénèse par la Lh lors de la puberté ?

Notre modèle d'exposition « pubertaire » chez la souris le suggère et nous montrons *in vitro* que les voies Fxr α -Dax-1/Shp sont capables dans les cellules de Leydig de réprimer les enzymes de la stéroïdogénèse indépendamment d'un signal Lh.

Cette action « locale » de Fxr α pourrait-elle être couplée à une diminution de la sensibilité des cellules de Leydig à l'axe hypothalamo hypophysaire ?

Nos données préliminaires soutiennent cette hypothèse : l'induction de Fxr α par les acides biliaires ou le GW4064 conduit *in vivo* à la répression de l'expression de *Lhr* dans le testicule. Nous proposons de confirmer ce point par plusieurs approches :

- Tout d'abord en comparant les concentrations de Lh plasmatique entre les souris témoins ou exposés par un régime 0,5% CA. S'il existe une résistance (partielle ou totale) des cellules de Leydig à la LH, celle-ci devrait voir ses concentrations plasmatiques augmentées (Volle et al., 2007).
- *In vitro*, dans une lignée cellulaire murine de Leydig (Ma10), un prétraitement par le GW4064 s'oppose-t-il à l'induction des enzymes stéroïdogènes par un traitement à la Lh (ou hCG)? Des données préliminaires vont dans ce sens (Figure 34 b). Il serait intéressant de connaître les statuts des transcrits *Lhr* et des voies qui lui sont sous-jacentes (Pka, P-Creb) en réponse à ces différentes conditions.
- Cette même expérience sera transposée *in vivo*. Des souris de 21 jours seront prétraitées avec du GW4064 ou le véhicule correspondant. Au terme du traitement, nous comparerons entre ces deux groupes les niveaux d'induction des enzymes stéroïdogènes en réponse à un traitement à la Lh (ou hCG) ainsi que les concentrations de testostérone testiculaires correspondantes.

Nos conclusions s'intégreraient de manière cohérente aux travaux réalisés par Van Thiel et Castilla (Castilla-Cortázar et al., 2004; Van Thiel et al., 1985). Chez le poulet et le rat pré-pubère, l'induction d'une pathologie hépatique se traduit par une atteinte sévère de l'histologie testiculaire (diminution du diamètre des tubes séminifères, perte d'intégrité de la barrière hémato testiculaire) associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de Lh révélatrice d'une résistance gonadique à la Lh (hypogonadisme primaire). Nos travaux permettraient de définir les acides biliaires, et plus précisément l'action de $\text{Fxr}\alpha$ testiculaire, comme pouvant être l'un des liens physiopathologiques justifiant dans ces modèles expérimentaux l'association entre troubles hépatiques et physiopathologie testiculaire.

Préciser l'implication de $\text{Fxr}\alpha$ dans le contrôle de la production des androgènes durant la puberté pourrait ouvrir des perspectives intéressantes chez l'homme. Aussi, pourrions-nous proposer l'augmentation des concentrations d'acides biliaires, et plus généralement la dérégulation des signalisations $\text{FXR}\alpha$, comme une étiologie potentielle aux pathologies pubertaires de l'enfant. Cette notion sera abordée dans la discussion générale de ce manuscrit.

Discussion et perspectives générales

Discussion et perspectives générales

A. Les acides biliaires testiculaires, un rôle physiologique ?

Nous avons mis en évidence la présence de concentrations détectables d'acides biliaires dans le testicule de souris C57Bl6 adultes (Article I, Baptissart et al., 2014). Nous savons à présent que les transcrits des récepteurs *Fxr* et *Tgr5* sont répartis respectivement dans les cellules de Leydig et la lignée germinale (Article I, Baptissart et al., 2014; Volle et al., 2007).

Ces observations suggèrent que les acides biliaires et leurs voies de signalisations puissent être des acteurs à part entière de la physiologie testiculaire. Pour répondre à cette hypothèse, il serait intéressant de répondre aux points suivants :

1. D'où viennent les acides biliaires ?

Le scénario la plus intuitif serait que les acides biliaires testiculaires proviennent d'une synthèse périphérique. Plusieurs arguments vont dans ce sens : 1) les profils d'acides biliaires plasmatiques sont superposables à ceux révélés au niveau testiculaire ; 2) un acide biliaire synthétique fluorescent injecté en intra-péritonéal est capable de s'accumuler dans le testicule (Baptissart et al., 2014).

Nous ne pouvons cependant pas exclure que le testicule soit le siège d'une synthèse endogène d'acides biliaires. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de l'équipe de Usheva (Smith et al., 2009). Les enzymes clefs des voies de synthèse classiques (CYP7A1, CYP27A1) et alternes (CYP27A1, CYP7B1) des acides biliaires sont exprimées et fonctionnelles dans les cellules de granulosa issues d'ovaires de femmes ; ces dernières sont capables en présence de cholestérol de synthétiser des acides biliaires.

Nos données préliminaires montrent que les transcrits des enzymes *Cyp7a1* (voie classique), *Cyp27a1* et *Cyp7b1* (voie alterne) sont exprimés dans le testicule de souris. Une stratégie de traitement par le busulfan (Article I, Baptissart et al., 2014) a permis de les localiser majoritairement dans les lignées somatiques.

- Pour préciser cette étude, nous nous proposons d'étudier l'expression de ces gènes dans les extraits de testicules humains rendus accessibles grâce à nos collaborations.
- Chez la souris, il nous faudra répondre à la question de la fonctionnalité des voies de synthèse. Pour cela, nous envisageons de mesurer le contenu en acides biliaires de cultures d'explants testiculaires en réponse à l'apport de cholestérol (dosage sur les extraits cellulaires et les milieux de culture).

Nous privilégions à ce jour l'hypothèse que les cellules de Leydig puissent être la source d'une synthèse testiculaire d'acides biliaires : 1) il s'agit de cellules stéroïdogènes possédant une réserve importante de cholestérol ; 2) tout comme les cellules de la granulosa, les cellules de Leydig murines expriment l'ensemble des acteurs de la régulation de la néo-synthèse des acides biliaires (*Fxra*, *Shp*, *Lrh-1*, *Lxra*). Nous vérifierons cette hypothèse par une expérience d'isolation de culture primaire de cellules de Leydig murines. Elle nous permettra :

- de vérifier la présence des transcrits des enzymes Cyp7a1, Cyp27a1 et Cyp7b1 dans des cellules de Leydig isolées.
- de la même manière que pour les explants, nous doserons les concentrations d'acides biliaires de ces extraits cellulaires et des milieux de culture correspondants.

2. Acides biliaires testiculaires : où sont-ils ?

La question de la biodisponibilité des acides biliaires est valable qu'ils soient issus d'une synthèse locale ou qu'ils proviennent de la synthèse périphérique (foie et intestin). Pouvoir déterminer leur localisation est primordiale pour comprendre le mode d'action par lequel ils pourraient intervenir dans le testicule. Il nous faudra dans ce cadre répondre aux questions suivantes :

Au contact de quels types cellulaires les acides biliaires sont-ils présents ? Quels récepteurs seraient-ils en mesure d'activer (Fxra intracellulaire / Tgr5 membranaire) ? Pour cela :

- nous localiserons les acides biliaires dans le testicule de souris témoins par une technique d'immunohistochimie (anticorps anti-acides biliaires) (Mano et al., 2004).

Une grande variété de transporteurs communs à plusieurs molécules endogènes ou exogènes est exprimée par les cellules de Sertoli. Certains sont impliqués dans le transport des acides biliaires au niveau hépatique (*Oatp1-3*, *Mrp2-4*) (Augustine et al., 2005). De plus, une étude montre que l'expression testiculaire des *Oatp1-3* est modifiée dans les souris *Fxra*^{-/-} comparées aux souris sauvages (Maeda et al., 2004). Ces observations suggèrent qu'il existe, dans le testicule, un ensemble d'acteurs régulant localement la diffusion des acides biliaires. Ces derniers pourraient alors contribuer au passage des acides biliaires à travers la BHT pour rejoindre le compartiment luminal ; ou à l'inverse, permettre leur efflux vers le compartiment basal afin de préserver les stades post-méiotiques de la lignée germinale de leur toxicité. Pour préciser ce point :

- nous analyserons l'expression testiculaire d'autres transporteurs impliqués dans la diffusion des acides biliaires (*Asbt*, *Ibabp*, *Bsep* ou *Osta/β*)
- nous en déterminerons la distribution par immunohistochimie. Des données préliminaires montrent que *Bsep* est exprimé dans le testicule total de souris témoins. Sa localisation protéique reste à définir.

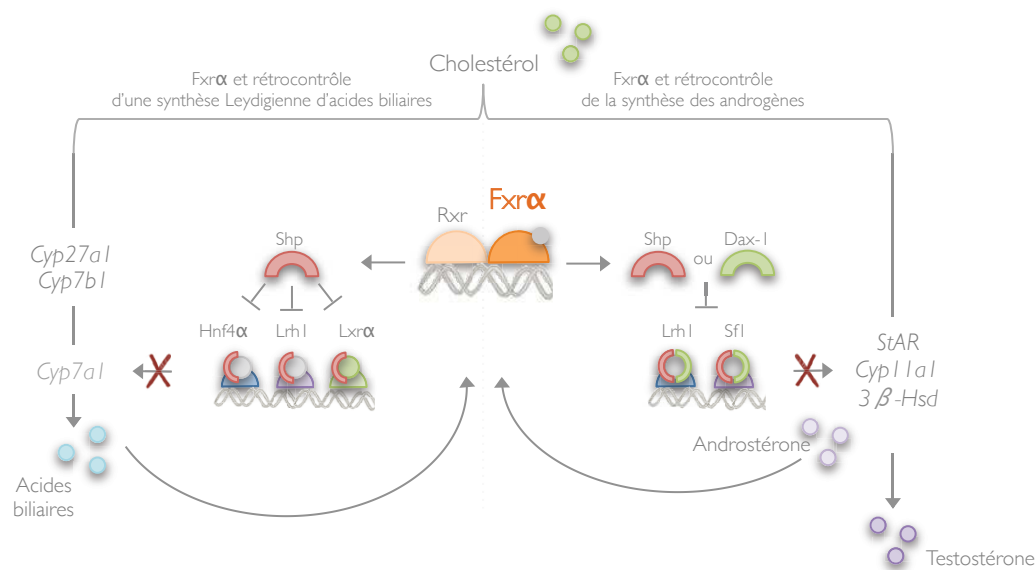


Figure 35. Fxrα et cellules de Leydig : un rôle physiologique ?

(Droite) L'induction de Fxrα par l'androstérone pourrait constituer un mécanisme de rétrocontrôle local de la stéroïdogénèse. (Gauche) Dans l'hypothèse d'une synthèse Leydigienne d'acides biliaires (*Cyp7a1* (voie classique), *Cyp27a1* et *Cyp7b1* (voie alterne)), l'induction de Fxrα par les acides biliaires aurait pour conséquence la répression de *Cyp7a1*. Tout comme dans le foie, Fxrα participerait de cette manière au rétrocontrôle de la synthèse des acides biliaires.

Cyp7a1, Cholesterol 7- α hydroxylase ; *Cyp27a1*, Sterol 27-hydroxylase ; *Cyp7b1*, Oxysterol 7- α hydroxylase ; *Hnf4 α* , Hepatocyte nuclear factor 4 α ; *Lxr α* , Liver x receptor α ; *Fxr α* , Farnesoid x receptor α ; *Rxr*, Retinoid x receptor ; *Shp*, Short heterodimer partner ; *Dax-1*, Dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 ; *Lrh1*, Liver receptor homolog-1 ; *Sf1*, Steroidogenic factor 1 ; *Star*, Steroidogenic acute regulatory protein ; *Cyp11a1* (P450scc), Cytochrome P450 side chain cleavage ; *3 β hsd*, 3- β hydroxysteroid dehydrogenase

3. Fxr α et Tgr5 : quels rôles physiologiques ?

Nous avons démontrés que les voies Fxr α et Tgr5 sont actives dans le testicule en réponse à de fortes concentrations d'acides biliaires. *Est-ce le cas en physiologie basale ? Pour quelles fonctions physiologiques ? Quels en sont les ligands endogènes ?*

3.1. En ce qui concerne Fxr α

Les données bibliographiques (Volle et al., 2007) et les éléments apportés par notre étude (Article III), suggèrent que Fxr α puisse contribuer au rétrocontrôle de la stéroïdogénèse Leydigienne et réguler localement l'équilibre de la synthèse de testostérone (Figure 35). Cette hypothèse est soutenue par le fait que l'androstérone, intermédiaire de la synthèse des stéroïdes, est capable *in vitro* de lier Fxr α et d'en induire l'activation (Wang et al., 2006b). Aucune variation des concentrations circulantes d'androgènes n'a toutefois été observée chez les souris invalidées pour *Fxr α* ^{-/-} à l'âge adulte (Volle et al., 2007). Ces études doivent néanmoins être précisées notamment en raison du phénotype complexe des animaux *Fxr α* ^{-/-} (cholestase spontanée). Dans ce contexte, nous proposons de réaliser un modèle murin invalidé pour *Fxr α* ^{-/-} spécifiquement dans les cellules de Leydig. Le choix d'une invalidation inductible permettra de dissocier les rôles de *Fxr α* à différents stades de la physiologie testiculaire (développement, puberté, maturité sexuelle) (souris Ert2-AmhrII-Cre x *Fxr α* *floxed/floxed*). Nos analyses consisteront à :

- suivre le profil endocrinien de ces souris (dosage testostérone testiculaire et plasmatique, oestrogènes testiculaires, Lh/Fsh).
- décrire le phénotype testiculaire qui lui est associé (levée de la répression des enzymes stéroïdogènes).
- en évaluer les conséquences sur les fonctions de reproduction (maturité sexuelle précoce ?)

Par ailleurs, et si la perspective d'une synthèse endogène d'acides biliaires est vérifiée, Fxr α pourrait tout comme dans le foie participer à la répression de l'expression de *Cyp7a1* que l'on montre exprimée dans le testicule murin. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les acteurs impliqués dans ce mécanisme sont présents dans les cellules de Leydig (Shp, Lrh-1, Lrx α). La présence des acides biliaires en tant que ligands endogènes de Fxr α prendrait alors tout son sens. Ils contribueraient à contrôler leur propre synthèse et réguleraient de manière indirecte la biodisponibilité du cholestérol dont ils sont issus.

3.2. Qu'en est-il de Tgr5 ?

Nous avons pour la première fois mis en évidence la présence de Tgr5 dans la lignée germinale. Notre étude montre que ses signalisations sont capables de participer à la régulation de la dynamique des jonctions de l'épithélium séminifère. Nous savons par ailleurs qu'elles pourraient être

directement ou indirectement impliquées dans la mise en place du profil épigénétique de la lignée germinale. Plusieurs intermédiaires de la stéroïdogénèse (progestérone et prégnandione) sont *in vitro* capables d'induire l'activité de *Tgr5* (Sato et al., 2008). Ces derniers issus de la cellule de Leydig, pourraient agir de manière paracrine sur les cellules germinales pour favoriser leur progression dans le compartiment luminal du tube séminifère. L'action endocrine (synthèse systémique), paracrine (synthèse leydigienne) des acides biliaires dans ce système reste par ailleurs à explorer. Tout comme ce qu'il est envisagé pour *Fxrα*, la caractérisation de l'inactivation de *Tgr5* dans les cellules germinales sera un élément clef pour comprendre son rôle physiologique. Nous possédons au laboratoire les souris nécessaires à l'obtention d'une lignée invalidée de manière inducible spécifiquement dans les cellules germinales (souris *Ert2-Prp-Cre*, Pr Chambon, IGBMC, Strasbourg). L'analyse du phénotype testiculaire de ces souris sera informative.

B. De la souris à l'homme.

1. Acides biliaire, *FXRα* et puberté : une question de « timing »

1.1. Le retard pubertaire

La définition clinique du retard pubertaire est l'absence d'augmentation du volume testiculaire au delà de 14 ans. Elle s'accompagne d'un défaut de maturation des caractères sexuels et de développement musculaire et d'une absence d'accélération de la vitesse de croissance normalement associée à la puberté. On distingue deux tableaux cliniques : l'un est définitif, l'autre réversible spontanément. Certains patients présentent de manière permanente un déficit gonadotrope (hypogonadisme hypogonadotrophique) ou des insuffisances gonadiques irréversibles (hypogonadisme hypergonadotrophique). Dans la plupart des cas la pathologie est associée à des anomalies génétiques telles que celles associées au syndrome de Klinefelter (Wikström et al., 2004) ou au syndrome de Kallmann (Fechner et al., 2008). Chez ces patients, une prise en charge est essentielle pour aboutir au développement pubertaire complet et à une activité sexuelle ultérieure normale. Elle consiste en un traitement à la GnRH pour les cas de déficit gonadotrophique ou à un traitement substitutif à dose progressivement croissante par de la testostérone dans les cas de pathologies gonadiques.

Le diagnostic le plus fréquent d'une puberté retardée (80% des cas) est un retard pubertaire dit « simple », se corrigeant spontanément avec le temps. Son étiologie est souvent mal comprise. Elle est entre autre associée à des maladies chroniques (maladie de Crohn), à la malnutrition (anorexie mentale), à la pratique sportive intense (danse, athlétisme) ou à des maladies endocriniennes (hypothyroïdie, hypercorticisme).

1.2. La puberté précoce

La puberté précoce est définie par le développement des caractères sexuels avant l'âge de 10 ans chez le garçon. Tout comme les pubertés retardées, elles peuvent être d'origine centrale ou périphérique.

Les pubertés centrales sont aussi appelées pubertés précoces vraies. Elles sont secondaires à une activation prématurée de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Dans 30% des cas son origine est neurogène (dans 50% associé à une tumeur) et le traitement de la tumeur est le premier recours thérapeutique (exérèse radiothérapie). Dans près de 70% elle demeure idiopathique. Plusieurs études lui attribuent une modification somato-psychique importante marquée par une accélération de la croissance et une soudure prématurée des cartilages de conjugaison. Dans ce contexte pathologique, un traitement par de fortes concentrations de GnRH exogène suppriment l'activité hypophyso-gonadique, et restaure la sécrétion de stéroïdes sexuels, ce qui permet de préserver le potentiel de croissance du patient.

Les pubertés périphériques sont connues sous le terme de pseudo-pubertés précoces. Elles sont secondaires à une production anormale de stéroïdes sexuels indépendante d'une stimulation hypothalamo-hypophysaire (tumeur surrénaliennes ou Leydigienne productrices d'androgènes).

1.3. FXR α et étiologie du défaut pubertaire chez l'homme ?

Notre étude montre pour la première fois le rôle délétère de l'activation supra-physiologique des signalisations Fxr α pour la mise en place de la fertilité chez la souris (Article III). Celle-ci est associée à l'action répressive de Shp (court terme) (Volle et al., 2007) et Dax-1 (moyen terme) (Article III présenté dans ce manuscrit) vis-à-vis de la stéroïdogenèse Leydigienne. Nos données préliminaires suggèrent que ce rétrocontrôle intrinsèque à la cellule de Leydig, soit associé à un défaut de sensibilité partiel à l'axe hypothalamo-hypophysaire (données non montrées, discussion Article II).

Dans ce contexte, nous pourrions proposer l'augmentation des concentrations d'acides biliaires, et plus généralement la dérégulation des signalisations Fxr α comme une étiologie potentielle aux pathologies pubertaires de l'enfant ?

a. FXR α : profils d'expression et dérégulations fonctionnelles

Nos travaux suggèrent que des modifications du profil d'expression de Fxr α et/ou la dérégulation de sa fonction intrinsèque (anomalies épigénétiques et/ou génétiques), puissent être des facteurs prédisposants voire suffisants au développement de pathologies pubertaires souvent mal

comprises chez l'enfant. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs données de la littérature associant des dérégulations de *Dax-1* ou *Shp* à des anomalies de mise en place de la fertilité.

Shp et puberté - Chez la souris, l'inactivation de *Shp* suffit à conduire à une maturation précoce du testicule (Volle et al., 2007). Celle-ci est entre autre attribuée à une levée de la répression des enzymes stéroïdogènes associée à une élévation des concentrations d'androgènes plasmatiques indépendamment de modulations des niveaux de Lh. A ce jour aucun modèle murin ne permet de statuer sur les conséquences d'une surexpression de *Shp* au niveau testiculaire. Chez l'homme aucune étude ne décrit de phénotype pubertaire qui puisse être lié à des dérégulations de l'expression ou de la fonction intrinsèque de SHP.

Dax-1 et puberté - Chez la souris, l'inactivation du gène codant *Dax-1* (Yu et al., 1998) comme sa surexpression (Swain et al., 1998), conduisent à des anomalies testiculaires d'ordre développemental (hyperplasie Leydigienne, réversion sexuelle) rendant difficile l'analyse de son rôle potentiel lors de la mise en place des fonctions testiculaires. Chez l'homme, des mutations de *DAX-1* se traduisent par une grande variabilité phénotypique soulignant la complexité de ses fonctions (Achermann et al., 2001). La plupart d'entre elles conduit à une insuffisance surrénalienne (AHC, *adrenal hypoplasia congenita*) et une déficience en gonadotrophines associée à un retard ou à l'absence totale de puberté. Alors que certains patients répondent à une stimulation de la synthèse d'androgènes à la suite d'un traitement GnRH, d'autres présentent une insensibilité périphérique révélatrice d'un défaut de réponse gonadique (Seminara et al., 1999 ; Tabarin et al., 2000). De manière intéressante des mutations de *DAX-1* conduisent, à l'opposé, à une puberté précoce en l'absence de gonadotrophines (Bassett et al., 1999)(Durmaz et al., 2013).

Fxrα et puberté - Nous ne disposons à ce jour que d'une lignée murine invalidée de manière globale pour *Fxrα*. La forte composante systémique du phénotype rend difficile les conclusions quant à la suppression de son activité dans les cellules de Leydig lors de la mise en place des fonctions de reproduction. De plus, aucune lignée murine surexprimant *Fxrα* n'a été établie à ce jour. Chez l'homme, l'influence d'épi-mutations, de mutations, ou variants du gène codant *FXRα* sur d'éventuels troubles pubertaires n'a pas été explorée. Il serait dans ce contexte intéressant :

- d'analyser les conséquences de la perte d'expression de *Fxrα* dans les cellules de Leydig chez la souris. Cette stratégie s'associera à celle développer dans le cadre de la recherche du rôle physiologique de *Fxrα* (souris *Ert2-AmhrII-Cre x Fxrα* floxed/floxed ; paragraphe A.3.1 de cette même discussion). Un modèle miroir surexprimant *Fxrα* permettra d'observer les effets de son gain d'expression.

- Nous mesurerons chez ces animaux les profils endocriniens (dosage testostérone testiculaire et plasmatique, oestrogènes testiculaires, Lh/Fsh), décrirons le phénotype testiculaire qui lui est associé (levée de la répression des enzymes stéroïdogènes) et en évaluerons les conséquences sur les fonctions de reproduction (puberté précoce ou retardée).
- De retour à l'homme, nous proposons de vérifier la présence d'épi-mutations, mutations et/ou de polymorphismes de FXR α chez des patients atteints de troubles pubertaires idiopathiques (gain de fonction – puberté retardée / perte de fonction – puberté précoce).

b. Les ligands FXR α : perturbateurs endocriniens ?

Au delà de l'aspect épi-mutationnel et/ou mutationnel évoqué précédemment, nos données pourraient permettre d'identifier l'origine de défauts pubertaires idiopathiques en proposant les acides biliaires comme un lien physiopathologique pertinent. Dans ce contexte, il sera tout d'abord nécessaire :

- de valider cette hypothèse en mesurant les concentrations d'acides biliaires chez des patients dont la puberté est retardée. La composition du pool d'acides biliaires sera informative quant à la présence de ligands favorisant l'activation des signalisations FXR α (enrichissement en CDCA). Il sera par ailleurs intéressant de considérer parallèlement à ce dosage les niveaux de LH et d'androgènes circulants.

Les retards pubertaires chez le garçon n'ont cessés de croître ces dernières années (Schoeters et al., 2008). Plusieurs études épidémiologiques associent cette tendance à l'exposition à des agents environnementaux de type perturbateurs endocriniens (Guo et al., 2004)(Staessen et al., 2001). Ces derniers sont définis selon l'OMS, comme « des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement des systèmes endocriniens et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants ». Les perturbateurs endocriniens agissent soit indirectement en modifiant la production, le stockage, le transport, la diffusion et l'élimination des hormones naturelles ; soit directement par interaction avec les récepteurs cellulaires, agissant comme un œstrogène par activation illégitime des récepteurs d'oestradiol ou comme un anti-androgène par réduction de l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes.

Le rôle de *Fxr α* pour le contrôle de l'homéostasie des hormones stéroïdes sexuelles a largement été évoqué dans ce manuscrit ainsi que dans l'article de revue présenté en annexe de ce manuscrit (Baptissart et al., 2013a). Nos données précisent aujourd'hui cette notion. *Pourrions-nous selon ces définitions considérer les agonistes ou antagonistes de FXR α comme des perturbateurs endocriniens à part entière ?*

Ce concept est soutenu par le fait que plusieurs composés naturels ou synthétiques sont clairement identifiés en tant que modulateurs des fonctions transactivatrices de FXR α .

Le stigmastérol est un phytostérol antagoniste de FXR α présent dans un grand nombre d'aliments. On le retrouve notamment dans les huiles de colza ou de soja (Carter et al., 2007). Ces dernières administrées aux nourrissons dans le cadre de nutrition parentérale sont d'ailleurs responsables de cholestases suite à la répression de l'activité de FXR α (Clayton MD et al., 1998). En 2004, les travaux de Hsu ont montrés l'action antagoniste de molécules xénobiotiques de type insecticide telles que le cyfluthrin ou le bifenthrin sur Fxr α (Hsu et al., 2014). Nos données soulèvent la question de la participation de ces molécules au développement de puberté précoce ?

Aux vues de ses multiples actions pour la régulation du métabolisme des acides biliaries, du cholestérol ou encore des triglycérides, plusieurs acides biliaries de synthèse, ligands agonistes ou antagonistes de FXR α ont été développés dans le but de lutter contre le développement de pathologies telles que l'hypertriglycémie (Thomas et al., 2008b). L'INT-447 (ou acide oléanolique ou 5-éthyl-CDCA) est aujourd'hui en cours de phase II de test clinique pour le traitement de la stéatose hépatique non-alcoolique (NASH), pathologie majeure de l'enfant (incidence estimée à 9,6%) (Manti et al., 2014). *Dans ce contexte, notre étude soulève la question des conséquences de l'exposition à de telles molécules lors de la puberté (retard pubertaire).*

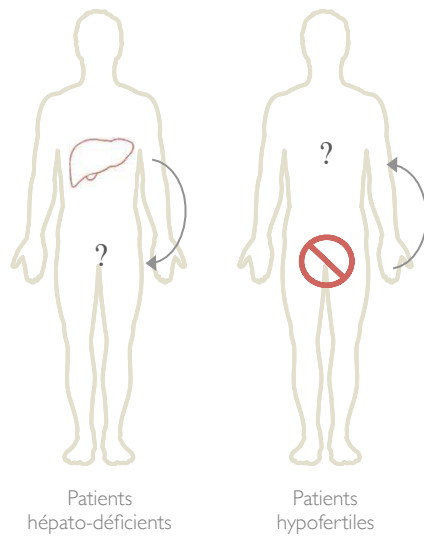
2. Les acides biliaries, TGR5 et infertilité

2.1. Acides biliaries : un outil diagnostique de l'infertilité ?

Notre modèle d'étude basé sur l'administration d'un régime enrichi en CA (0,5%) mime, chez la souris adulte, une augmentation des concentrations plasmatiques d'acides biliaries comparable à celles retrouvées chez l'homme dans le cadre de pathologies hépatiques chroniques auxquelles ont pu être associés des troubles de la fertilité (Mooradian et al., 1985). Nos conclusions ont permis, dans ce cadre, de définir une corrélation stricte entre les concentrations plasmatiques d'acides biliaries totales et la diminution du nombre de petits par portée. En relation avec la Tgr5-dépendance du phénotype ce lien est conservé lorsque l'on considère les concentrations de DCA.

Transposées à l'homme, ces données ouvrent des perspectives intéressantes pour proposer le dosage du contenu sérique en acides biliaries comme un nouvel outil diagnostique dans le cadre de l'infertilité. Cette application apparaîtrait d'autant plus pertinentes si elle s'étendait à l'évaluation des profils d'acides biliaries dans l'éjaculat ; en complément du dosage sérique, ce paramètre permettrait d'évaluer au mieux ce qui est attendu de l'accumulation des acides biliaries au niveau des tissus de la sphère urogénitale. Elle n'en serait donc que plus représentative des atteintes testiculaires suspectées.

A.



B.

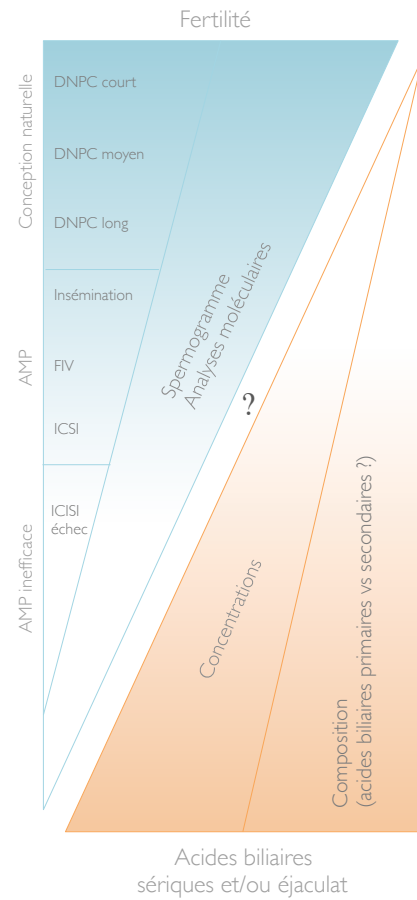


Figure 36. Acides biliaries et infertilité : de retour à l'homme.

Recherche d'une corrélation entre l'infertilité et les profils d'acides biliaries plasmatiques et/ou séminaux **A.** Deux populations de patients seront sélectionnées : ceux souffrant d'un trouble hépatique d'ores et déjà déclaré et ceux présentant une infertilité caractérisée. **B.** Nous relèverons chez ces patients les paramètres nécessaires à l'évaluation de leur fertilité (gradient bleu). Nous les comparerons à l'évaluation des profils d'acides biliaries plasmatiques et séminaux (quantité, composition) (gradient orange). DNPC, délais nécessaire pour concevoir ; FIV, fécondation *in vitro* ; ICSI, *intracytoplasmic sperm injection* ; AMP, assistance médicale à la procréation.

Nos données préliminaires sont en ce sens encourageantes (Collaboration John Flanagan, Stockholm, Sweden). Elles ont permis d'identifier la présence de concentrations détectables d'acides biliaires dans le liquide séminal humain.

Nous nous proposons à présent de rechercher chez l'homme l'existence d'une corrélation entre l'infertilité et les profils d'acides biliaires plasmatiques et/ou séminaux (quantité et composition). Notre approche sera basée sur l'étude croisée de deux profils cliniques distincts et complémentaires (Figure 36) : une cohorte de patients souffrant d'un trouble hépatique d'ores et déjà déclaré d'une part, et une population de patients présentant une infertilité caractérisée d'autre part. Tout d'abord, le statut de fertilité de chaque patient sera précisément caractérisé :

- Chez les hommes présentant un trouble hépatique, nous prendrons en compte leur capacité à donner naissance naturellement à un enfant sur la base de la détermination du délai nécessaire pour concevoir.
- Dès lors que certains de ces patients auront eu recours à un protocole d'assistance médicale à la procréation (AMP), les paramètres d'analyses seront communs à l'ensemble des patients inclus dans l'étude (trouble hépatique et infertilité). Nous relèverons :
 - le caractère de la démarche AMP auquel les patients ont dû faire appel (insémination artificielle, FIV, ICSI), et le taux de réussite de cette dernière (nombre de tentatives ramenées au nombre de grossesses efficaces)
 - les critères d'évaluation du spermogramme ; aux vues de nos conclusions chez la souris, nous porterons une attention particulière aux paramètres de numération spermatique ainsi qu'à la qualité de la condensation nucléaire des spermatozoïdes.
 - les paramètres moléculaires reliés à la qualité de l'épigénome des spermatozoïdes de ces patients (niveaux de méthylation globale, ratio histone/protamine, niveaux H3K4me2...)

L'ensemble des données recueillies sera mis en relation avec l'évaluation des profils d'acides biliaires plasmatiques et séminaux de ces mêmes patients (quantité et composition).

- Nos travaux consisteront à définir les critères les plus pertinents pouvant les relier à la fertilité : concentrations d'acides biliaires totales, enrichissement en acides biliaires secondaires en faveur de l'activation de Tgr5...
- Il sera par ailleurs intéressant de rechercher la présence d'éventuelles épi-mutations, mutations et/ou polymorphismes de TGR5 pouvant être associée à l'infertilité.

Au final, les conclusions de ces travaux pourraient permettre pour la première fois :

- d'établir des corrélations entre des dérégulations du métabolisme des acides biliaires et l'infertilité chez l'homme,
- d'identifier l'un des liens moléculaires expliquant la corrélation établie entre hépatopathies et hypofertilités,
- de mettre en évidence l'origine de troubles testiculaires chez des patients souffrant d'hypofertilités idiopathiques.

2.2. Les acides biliaires : infertilité, AMP et conséquences

Les problématiques liées à la fertilité touchent de plus en plus d'hommes et de femmes en désir d'enfant. En France, 1 couple sur 6 est aujourd'hui concerné, soit l'équivalent de 500 000 couples consultant chaque année pour des difficultés à concevoir naturellement à un enfant. Dans près de la moitié des cas, un facteur masculin contribue à l'infertilité et dans 20%, il en est la seule cause (Freour et al., 2010).

Face à ce constat, l'AMP a connu un développement important depuis la réussite des premières FIV il y a trente ans. En 2011, 23 127 enfants sont nés des suites d'une AMP, soit l'équivalent de 2,8% des naissances recensées la même année (registre FIVNAT). Avec l'avènement de l'ICSI, il est même devenu possible de traiter certaines infertilités masculines particulièrement sévères. Dans 20% des cas l'engagement d'un protocole AMP concerne des infertilités dont l'origine reste inexpliquée.

De plus en plus sollicité, le rendement des techniques d'AMP demeure aujourd'hui insatisfaisant. Les chances de grossesses échographiques varient aujourd'hui de 13 à 30 % étant précisé que ces chiffres ne prennent pas en compte le fait que ces dernières ne se traduisent pas toujours par la naissance d'un enfant (fausses couches, interruptions médicales de grossesse...).

Néanmoins, l'usage des techniques d'AMP pose incontestablement la question des risques encourus pour l'enfant à naître. Plusieurs études de cohorte conduites en France et à l'étranger ont mis en évidence une diminution du poids de naissance chez des enfants nés de protocoles de FIV ou d'ICSI, non pas seulement en raison de grossesses multiples, mais également en cas de grossesse unique (Bergh et al. 1999, Schieve et al. 2002). Par ailleurs, d'autres études montrent que parmi les enfants atteints de pathologies liées à l'empreinte parentale, (Beckwith-Wiedemann, Prader Willi, d'Angelman, Silver-Russell), la proportion de ceux nés d'AMP est particulièrement élevée (Cox et al. 2002, Sutcliffe et al. 2006). De plus, il est aujourd'hui reconnu qu'un garçon né par ICSI hérite de la stérilité de son père.

Dans un contexte où l'incidence des troubles hépatiques n'a cessée d'augmenter ces dernières années (29 millions de malades en Europe-données EASL), nos données suggèrent que les acides biliaires puissent contribuer au constat encore fragile de l'AMP et ce sur deux aspects : a. celui du manque d'efficacité de la FIV en lien avec l'absence de marqueurs efficaces de la qualité des spermatozoïdes sélectionnés, b. celui des répercussions de l'AMP sur la santé des enfants qui en sont issus.

a. Les acides biliaires : marqueurs d'efficacité de l'AMP

Au delà de l'infertilité définie par des paramètres purement quantitatifs (diminution du nombre de spermatozoïdes, diminution du nombre de fécondations), le traitement de souris par les acides biliaires se traduit par une atteinte qualitative de l'épigénome du gamète. Celle-ci conduit notamment à des troubles développementaux de la descendance associés à une mortalité *in utero*. En ce sens, une étude clinique menée par Zhou et al. en 2011 a démontré que l'infertilité retrouvée dans le cas d'infection à l'hépatite B est associée à un mauvais pronostic lors du recours à un protocole d'ICSI. Celui-ci s'explique notamment par un nombre particulièrement élevé de défauts implantatoires des embryons corrélé à une diminution du nombre de grossesses efficaces (Zhou et al., 2011). Dans ce contexte, nos données suggèrent que la dérégulation des profils d'acides biliaires pourrait contribuer à ce constat.

L'évaluation des profils d'acides biliaires (quantité et composition) dans le sang ou l'éjaculat d'homme faisant appel à l'AMP pourrait :

- permettre de déterminer, chez certains hommes, les causes d'un rendement insatisfaisant,
- être un marqueur pertinent pour définir la qualité des gamètes sélectionnés,
- guider le choix de prise en charge en évoquant la notion de risque lié au rendement.

b. Les acides biliaires et la question des conséquences sur la descendance

Nos travaux dans la recherche du lien physiopathologique entre fertilité et troubles hépatiques ont ouverts des perspectives, alors inattendues, d'un impact transgénérationnel de l'exposition aux acides biliaires. Les petits F1 et F2 issus de mâles nourris par un régime 0,5% CA présentent une mortalité postnatale importante, une forte susceptibilité au développement de syndrome métabolique (diminution poids du corps, hyperglycémie), ainsi qu'une hypofertilité héréditaire. Cet impact est dépendant de la signalisation Tgr5 et l'hypothèse de la transmission d'une altération épigénétique est par le gamète est aujourd'hui privilégiée.

Dans un contexte où les données cliniques estiment à 20% le nombre de personnes atteintes du syndrome métabolique et où l'infertilité ne cesse d'augmenter, nos travaux proposent les acides

biliaires comme un nouveau facteur transgénérationnel de prédisposition au développement de ces pathologies.

Aussi, nous pourrions soulever la question de la participation du recours à l'AMP dans l'amplification de ce phénomène.

A cet aspect s'ajoute le fait que des agonistes des signalisations FXR α et TGR5 sont aujourd'hui envisagés en tant que molécules thérapeutiques dans le cadre de pathologies courantes de notre société (obésité, diabète, stéatose hépatique (NASH)). Notre étude permettra dans ce contexte d'alerter les instances sanitaires (Agence Nationale de sécurité du Médicament, ANSM) quant-aux conséquences de l'accès à de tels traitements sur les fonctions de reproduction. A terme, l'identification des mécanismes moléculaires par lesquels les voies TGR5 et/ou FXR α affectent les fonctions testiculaires pourrait permettre de définir de meilleures pistes thérapeutiques palliant à l'effet négatif de ces derniers sur la fertilité et les futures générations.

Annexes

Annexe I

Bile acids : from digestion to cancer

Baptissart *et al.*, 2013

Biochimie



Review

Bile acids: From digestion to cancers[☆]



Marine Baptissart^{a,b,c,d}, Aurelie Vega^{a,b,c,d}, Salwan Maqdasy^{a,b,c,d,e},
Françoise Caira^{a,b,c,d}, Silvère Baron^{a,b,c,d}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,c,d},
David H. Volle^{a,b,c,d,*}

^a INSERM U 1103, Génétique Reproduction et Développement (GRéD), F-63177 AUBIERE, France

^b Clermont Université, Université Blaise Pascal, GRéD, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

^c CNRS, UMR 6293, GRéD, F-63177 AUBIERE, France

^d Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

^e Service d'endocrinologie, diabétologie, maladies métaboliques, Centre Hospitalier Universitaire et Université d'Auvergne, F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2012

Accepted 21 June 2012

Available online 3 July 2012

Keywords:

Bile acids

FXR α

TGR5

Cancer

ABSTRACT

Bile acids (BAs) are cholesterol metabolites that have been extensively studied these last decades. BAs have been classified in two groups. Primary BAs are synthesized in liver, when secondary BAs are produced by intestinal bacteria. Recently, next to their ancestral roles in digestion and fat solubilization, BAs have been described as signaling molecules involved in many physiological functions, such as glucose and energy metabolisms. These signaling pathways involve the activation of the nuclear receptor FXR α or of the G-protein-coupled receptor TGR5. These two receptors have selective affinity to different types of BAs and show different expression patterns, leading to different described roles of BAs. It has been suggested for long that BAs could be molecules linked to tumor processes. Indeed, as many other molecules, regarding analyzed tissues, BAs could have either protective or pro-carcinogen activities. However, the molecular mechanisms responsible for these effects have not been characterized yet. It involves either chemical properties or their capacities to activate their specific receptors FXR α or TGR5. This review highlights and discusses the potential links between BAs and cancer diseases and the perspectives of using BAs as potential therapeutic targets in several pathologies.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Physico-chemical function and biosynthesis: old stories...

With cholesterol, phospholipids and bilirubin, bile acids (BAs) are the main component of bile. Present in digestive tract during the meal, they ensure fat solubilization and emulsification and thus promote digestion [1]. This property is mainly due to their amphipathic nature.

In adult human, around 500 mg of cholesterol are converted into BAs per day. Their synthesis takes place in liver and involves a series of enzymatic modifications of cholesterol at both sterol ring and lateral side chain. There are two different synthetic pathways. The first one,

known as classical pathway, involves CYP7A1 and CYP8B1, the second named alternative pathway, involves cytochromes CYP27A1 and CYP7B1. Both syntheses lead respectively to production of so-called primary BAs: cholic acid (CA) and chenodeoxycholic (CDCA) [2] (Fig. 1). BAs greatly differ between species. It has to be noticed that mice present muricholic acids derived from chenodeoxycholic acid which is more hydrophobic and less toxic for cells than CDCA.

During the entero-hepatic cycle, in distal ileum as well as in colon, small part of BAs could be deconjugated and enzymatically modified by intestinal microflora [3]. These transformations lead to secondary BA, namely deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid [4], respectively originating from CA and CDCA [4]. By the end, conjugated BAs represent 98% of the pool.

In liver, primary and secondary BAs are coupled with amine residues (glycine or taurine) leading to production of amphipathic bile salts tauro- and glyco-conjugated and stored in gallbladder. After meal BAs and their conjugates are delivered in duodenum to facilitate digestion and absorption of fats and liposoluble vitamins in the intestine throughout the enterocyte barrier (Fig. 2). Indeed, BAs are transported from apical surface into enterocytes by the

[☆] This study was supported by ANR JCJC (#JCJC1103 01).

* Corresponding author. "Génétique Reproduction et Développement", Inserm U1103, Unité Mixte de Recherche CNRS 6293, Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP80026, 63171 Aubière Cedex, France. Tel.: +33 (0) 473407415; fax: +33 (0) 473407042.

E-mail address: david.volle@inserm.fr (D.H. Volle).

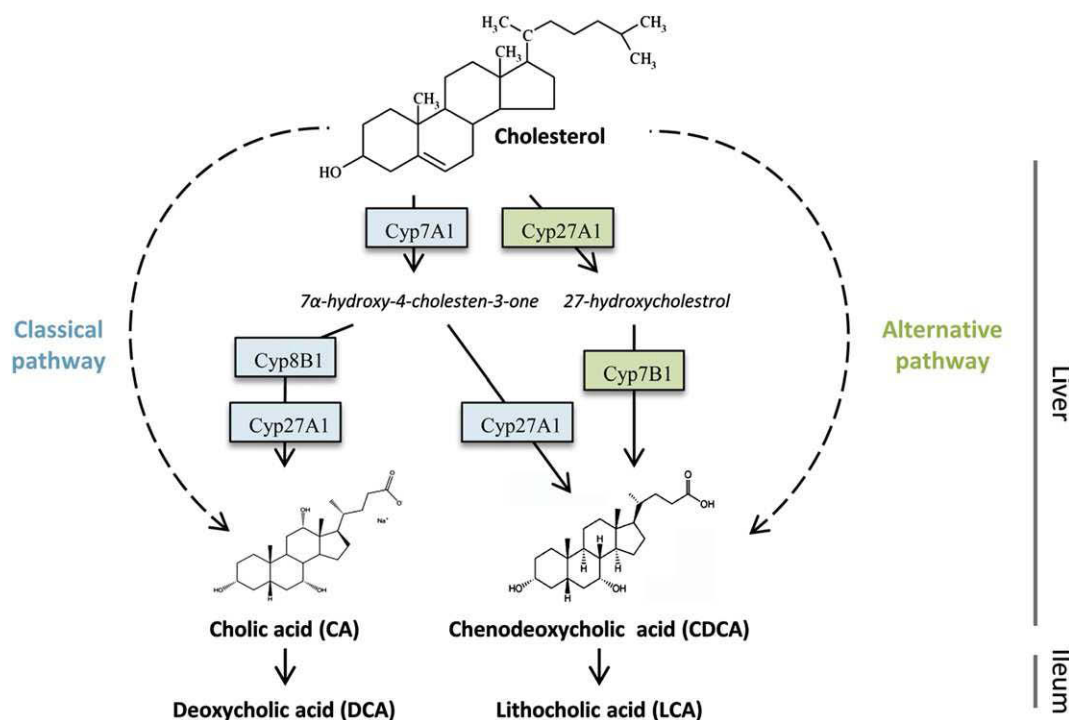


Fig. 1. Schematic representation of pathways of BA synthesis. BA synthesis takes place in the liver. They are formed from cholesterol. The classical pathway involves among other cytochromes CYP7A1, CYP27A1 and CYP8B1; alternative pathway involves cytochromes CYP27A1 and CYP7B1. Both lead to the production of primary BAs, cholic acid (CA) and chenodeoxycholic (CDCA). Then, they are converted into secondary BAs by bacterial flora in the ileum: deoxycholic acid (DCA) and lithocholic [4], respectively.

apical sodium-dependent BAs transporter ASBT (Apical Sodium-Dependent Bile acid transporter). Then, BAs are bound to the ileal BA binding protein IBABP, transported across cell to basolateral membrane, and exported by the heterodimeric organic solute transporter OST α/β [5].

In ileum and colon, the majority of BAs (95%) is reabsorbed and recycled in liver. Thus, neo-synthesized BAs can be excreted again, 20–40 times during digestion. This recycling mechanism, called entero-hepatic cycle, involves a system of tightly regulated transporters ensuring not only the maintenance of BAs metabolism, but also the control of cholesterol homeostasis from which they are derived [6].

1.2. BAs as cell signaling molecules: a new story begins...

In addition to their mechanical role, BAs have been described as signaling molecules binding two specific receptors: the nuclear receptor Farnesol-X-receptor (FXR α , NR1H4) and G-protein-coupled receptor TGR5 (GPBAR1, G-protein-coupled bile acid receptor).

1.2.1. The nuclear receptor for bile acids: FXR α

Identified in liver, intestine, or kidney, FXR α belongs to nuclear receptor superfamily [7]. More potent ligands for FXR α are CDCA and its conjugated forms [8]. It acts as an obligatory heterodimer with retinoid X receptor (RXR). This heterodimer binds to specific IR1 (inverted repeat-1) sequences on target gene promoters and then regulates their transcription. FXR α has been involved in regulation of many physiological functions. Among them, mouse model invalidated for *Fxr α* gene (*Fxr α* –/–), allows to highlight its involvement in regulating BAs biosynthesis and entero-hepatic cycle [9]. *Fxr α* –/– mice exhibit high BA plasma levels associated with abnormal hepatic biosynthesis, due to an alteration of FXR α -mediated negative feed-back on BA biosynthesis. The molecular mechanisms involved have been described (Fig. 3). In liver, FXR α represses *Cyp7a1* gene expression, a key enzyme of BA biosynthesis. At molecular level, in mouse models, this pathway involves

several other members of nuclear receptor superfamily, such as SHP (Small heterodimer partner, NR0B2), LRH1 (Liver receptor homolog-1, NR5A2), or LXR α (Liver X Receptor α , NR1H3) [10]. It is interesting to note that in human, the regulation of *Cyp7a1* doesn't not exist, what highlights the differences between species [11]. In parallel, FXR α protects liver from toxic effects of accumulated BAs. In hepatocytes, FXR α decreases BA uptake *via* repression of Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion-transporting polypeptide (OATP)-1 and OATP-4 expressions [12]. It also promotes BA excretion in bile ducts through transcriptional induction of the specific BA transporter BSEP (Bile salt export pump) in hepatocytes [6]. This effect is related to BA decreased excretion in digestive tract of *Fxr α* mutant mice [9].

FXR α is also involved in controlling lipid and glucose homeostasis as suggested by high plasma triglycerides concentrations in *Fxr α* –/– mice [13] (Fig. 3). *Via* a SHP-dependant pathway, FXR α limits triglyceride synthesis. Indeed, it inhibits the expression of enzymes involved in triglyceride synthesis such as sterol-regulatory-element-binding (SREBP1-c), fatty-acid-synthase (FASN) and stearoyl coenzyme A desaturase-1 (SCD-1) [14]. In parallel, FXR α controls blood glucose by lowering expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), a key enzyme of gluconeogenesis, and glucose-6-phosphatase (G6P) involved in glycogenolysis reactions [15] (Fig. 3).

1.2.2. G-protein-coupled receptor for BAs: TGR5

TGR5 is a member of G-protein-coupled receptors family with seven transmembrane domains. It has been recently recognized as BA receptor [16] more particularly for LCA and DCA [17]. TGR5 agonist activates protein kinase-A (PKA) pathway leading to cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) phosphorylation which induces expression of its target genes, even though most of these transcriptional targets need to be identified (Fig. 4).

Expressed predominantly in liver, intestine or brown adipose tissues, TGR5 has been implicated in regulation of multiple

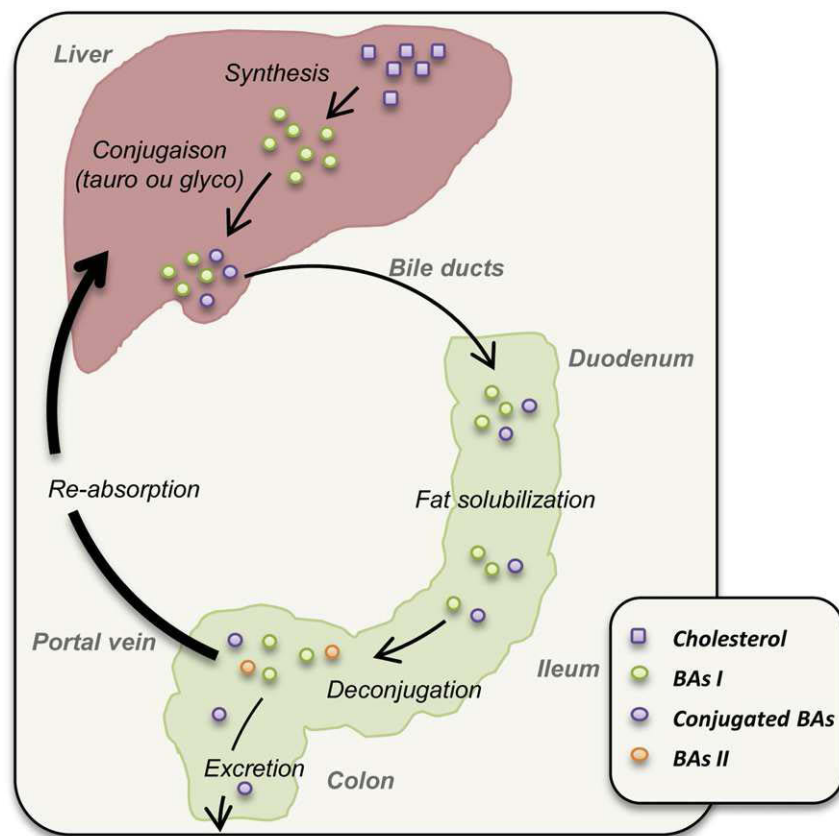


Fig. 2. Schematic representation of the entero-hepatic circulation of BAs. Primary BAs neo-synthesized in the liver are conjugated with glycine or taurine. Then, BAs are stored in the gallbladder and excreted into bile in the duodenum where they participate to the digestion of fats. In the ileum, under the action of intestinal bacteria, BAs are deconjugated and converted into secondary BAs. In the colon, the majority of BAs is reabsorbed and transported by the portal vein to the liver to participate in a new round of digestion. Excess of BAs is eliminated by the feces.

metabolic functions. TGR5 knockout mice are predisposed to obesity in response to high fat diet [18]. This is consistent with the fact that, in response to BAs, TGR5 promotes energy expenditure through thyroid hormone T3 activation by the iodothyronine deiodinase 2 enzyme (DIO2) [19]. This increases β -oxidation of fatty acids in brown adipose tissue or skeletal muscle, in mouse and human cells, and thereby promotes the conversion of fat into energy. Next to this, it has been demonstrated that, through GLP-1 synthesis regulation in entero-endocrine cells [20], TGR5 participates in insulin release from pancreas, and then favors glycemia regulation.

2. Bile acids and gastro-intestinal cancer development

2.1. Esophagus adenocarcinoma

With an incidence increasing in western countries over the past decades, esophageal cancer is the seventh leading cause of cancer-related death worldwide [21]. There are two main histological types of esophageal cancers, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. It is now well established that Barrett's esophagus (BE) constitutes a major risk factor for esophageal adenocarcinoma (EA) development [22]. Indeed, recent data consider that patients with BE disease have an estimated 30–125 fold increased risk of developing esophageal cancers [23]. BE syndrome is defined by presence of metaplastic lesions where damaged squamous cells are replaced by columnar epithelium. This phenomenon occurs during healing of esophageal mucosal injury typically triggered by gastro-esophageal reflux diseases (GERD) [24–26]. Characterized by an

incompetence of the lower esophageal sphincter and a disturbed clearance of esophagus, this pathology increases esophagus exposure not only to acidity from stomach but also to BAs from duodenum [24].

2.1.1. BAs and esophagus diseases

The involvement of BAs in the progression from BE disease to EA is now well established. Indeed, many studies in humans show that not only concentration, nature but also length of exposure of mucous membranes to BAs are correlated with the degree of pathology [24,27,28].

Several surgical models of GERD have been shown to result in EA development without exogenous carcinogen [29–31]. Furthermore, one study shows that zinc deficient diet containing DCA supplementation increases reactive oxygen species (ROS) production and leads to BE-like lesions in mice [32]. Moreover, *ex-vivo* and *in vitro* experiments, using either biopsies or cell lines derived from patients with GERD, show that exposure to BAs induces expression of inflammatory mediators (e.g. Interleukin-8 (IL-8), cyclooxygenase (COX-2)), oxidative stress and DNA damage that could be linked to mutational events leading, over a longer period, to development of resistant apoptotic cells and ultimately cancer [33].

However, the exact molecular pathways involved remain unclear. Few studies have investigated the implication of BAs receptors in the development of BE disease and adenocarcinoma.

2.1.2. Is FXR α involved?

2.1.2.1. FXR α expression and disease progression. The first evidence suggesting the involvement of FXR α in BE disease and

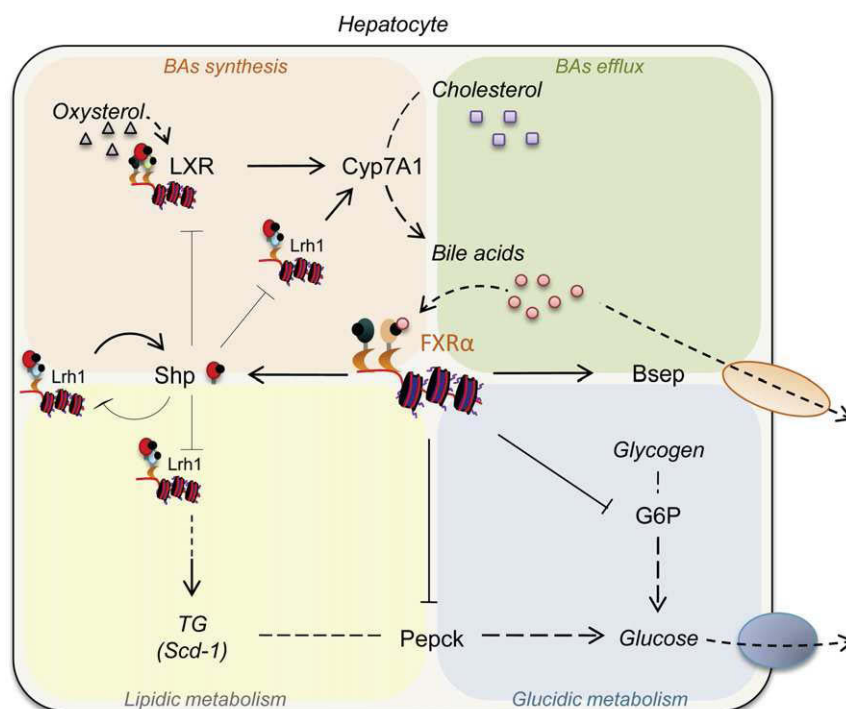


Fig. 3. The nuclear receptor FXR α is involved in regulating hepatic lipid carbohydrate and BA metabolisms. FXR α , through its target gene SHP (Small heterodimer partner), regulates the transcription of enzymes involved in synthesis of BAs and triglycerides [119]. It also participates in the efflux of BAs by activating the transcription of BSEP (bile salt export pump) and the control of gluconeogenesis and glycogenolysis via PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) and G6P (Glucose-6-phosphatase). Note that LXR α controls mouse *Cyp7a1* gene expression and that this regulation doesn't exist in human. LRH1 (Liver receptor homolog-1), LXR (Liver X receptor), SCD-1 (Stearoyl coenzyme A desaturase-1).

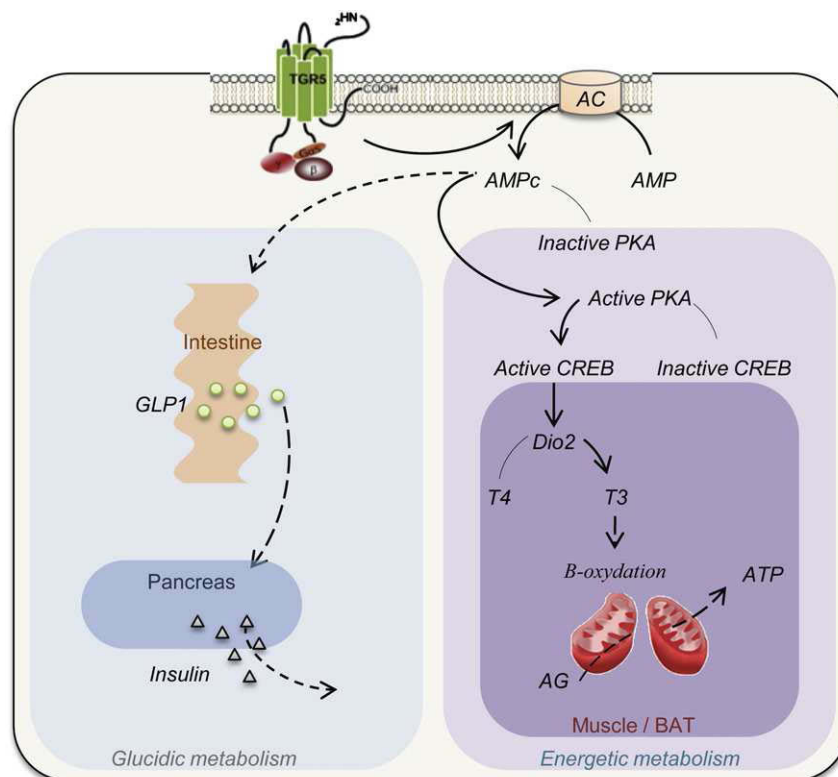


Fig. 4. The G-protein-coupled receptor TGR5 participates in the control of carbohydrate and energy metabolisms. Stimulation of TGR5 activates the adenylate cyclase (AC) and causes the production of cAMP. Activated protein kinase-A phosphorylates the transcription factor CREB (cAMP-responsive-element-binding protein). The latter induces the expression of the gene encoding the enzyme DIO2 (deiodinase iodothyronine 2) that induces production of the thyroid hormone T3 and promotes β -oxidation of fatty acid (FA) in brown adipose tissue or muscle. In the enterocytes, cAMP pathway allows the synthesis of the GLP-1 (glucagon-like peptide-1), thus promoting the release of insulin from the pancreas.

adenocarcinoma development was recently reported by several studies showing increased FXR α expression along the progression from normal esophagus to BE disease [34–36]. In patients with BE disease, FXR α is overexpressed in both esophageal squamous epithelium and specialized intestinal BE cells, while almost no FXR α was found in healthy squamous epithelium. Furthermore, loss of FXR α expression has been reported in EA probably due to low grade differentiation [34].

The origin and the significance of these changes in FXR α expression were reported in several clinical and epidemiological studies. During chronic GERD, squamous epithelium cells are replaced by intestinal type epithelium. As enterocytes express FXR α , this modification in cell population may in part contribute to the over-expression described in epithelium of patients with BE disease.

Unlike esophageal epithelium cells, enterocytes are adapted to transport BAs from lumen back to bloodstream by both apical and basolateral transporters controlled by FXR α . Recently Dvorak et al. [37] demonstrate in human that, like FXR α , BA transporters IBAT, IBABP or multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) expressions are increased in non dysplasia esophageal cells compared with normal squamous epithelium. This suggests an adaptive mechanism to protect cells from components of reflux particularly from BAs. Interestingly, DCA treatment increases *Fxr α* and *Ibabp* mRNA level in human TE7 esophageal cell line suggesting that BAs may be involved in the establishment of this adaptive mechanism [36].

On the other hand, decreased mRNA levels of BA transporters were observed during progression of Barrett's esophagus and adenocarcinoma consistent with decreased expression of FXR α [37]. This decline in transporter expression may be responsible, at least in part, for the increased cellular damage due to excessive intraluminal BAs concentrations. Another hypothesis proposes that this phenomenon may also be considered as a further adaptive response to high BAs exposure in order to limit DNA damage of premetaplastic cells [37].

All these data suggest that, through regulation of BA transporters, FXR α controls an adaptive mechanism to lower esophagus exposure to BAs toxicity in BE and adenocarcinoma.

2.1.2.2. FXR α promotes inflammation. Chronic inflammation of epithelial cells in GERD was shown to play a key role in the transition from Barrett's syndrome to adenocarcinoma.

Chemokines such as macrophage inflammatory protein-3 α (MIP3 α) or IL-8 have been shown to promote inflammatory response by increasing the influx of immune cells such as neutrophils and β -cells [38]. Compared to the squamous epithelium of Barrett's syndrome patients, their columnar epithelium displayed an increase in MIP3 α and IL-8 levels with enhanced expression of FXR α and FXR α targets genes suggesting involvement of FXR α in initiation and maintenance of the inflammatory response in BE [36].

In line with these data, *in vitro* experiment shows that exposure of human esophageal TE7 cell line to DCA results in increased mRNA levels of MIP3 α and IL-8 [36]. Interestingly, pretreatment with guggulsterone, a natural FXR α antagonist, inhibits this pro-inflammatory response suggesting a direct involvement of FXR α in the enhanced inflammatory reaction seen in patients with BE [36].

2.1.2.3. FXR α induces apoptosis resistance. Previous studies demonstrate that the transformation of Barrett's syndrome to adenocarcinoma is related to a loss of apoptotic mechanism [39]. Several biopsies analyses indicate reduced apoptosis in BE tissues which may contribute to progression to EA. This is highlighted by the expression of proapoptotic and anti-apoptotic signaling molecules such as Bcl-xl or Bax [40]. Moreover, human BE epithelial cells

treated *ex-vivo* with DCA present resistance to apoptosis compared to esophageal squamous epithelium [41]. In this context, involvement of FXR α in regulation of apoptosis has been suggested by *in vitro* experiments showing that antagonizing FXR α with guggulsterone treatment significantly enhances apoptosis in a human BE-derived cell line [34]. While suggesting the involvement of FXR α in promoting inflammation and resistance to apoptosis, an FXR α -independent effect of guggulsterone cannot be excluded. Indeed, in further studies guggulsterone was shown to suppress the activation of a nuclear factor-kappa B (NF- κ B) induced by tumor necrosis factor α (TNF- α) and chemotherapeutic agents through inhibition of I κ B kinase (IKK) [42]. By this pathway, guggulsterone leads to the inhibition of p65 phosphorylation, nuclear translocation, and down-regulation of target genes involved in anti-apoptosis and inflammatory pathways. However, the precise mechanism by which guggulsterone leads to IKK inhibition remains unknown and the hypothesis implicating its FXR α antagonist property remains to be explored.

2.1.3. Does TGR5 may also be involved?

The potential role of TGR5 in EA tumorigenesis has been recently discussed for the first time by Hong et al. [43]. Unlike FXR α , TGR5 mRNA and protein levels were significantly higher in human EA than in normal esophageal mucosa or Barrett's mucosa suggesting that it might play a central role in adenocarcinoma development.

In the human EA cell lines FLO or BAR-T, low dose of TDCA increases NADPH oxidase NOX-5S expression leading to peroxide production and increased proliferation rate [43]. Interestingly, in these cell lines, TGR5 knockdown by siRNA strategy reduces significantly BA induced NOX-5S expression, H₂O₂ production and cell proliferation [43]. In contrast, over-expression of TGR5 increases these effects [43].

These data define TGR5 as a mediator of ROS production and increased proliferation induced by BA exposure. Thus, TGR5 activity could be involved in evolution of Barrett's syndrome to adenocarcinoma.

2.1.4. Conclusion

BAs seem to play important roles throughout the progression of BE disease leading to EA. FXR α intervenes during early steps leading to BE disease by promoting inflammation and resistance to apoptosis (Fig. 5).

Regarding TGR5, its high expression in EA suggests its potential role in adenocarcinoma development. Indeed, mediating ROS production and increasing proliferation induced by BAs exposure, TGR5 activity must be involved in evolution of Barrett's syndrome to adenocarcinoma (Fig. 6).

2.2. Hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma is the third leading cause of cancer deaths worldwide. In developed countries, its incidence has particularly increased in the last twenty years with 500 000 people affected a year [21]. Hepatocarcinoma is a frequent complication in patients with cirrhosis caused by chronic inflammatory diseases like non-alcoholic steatohepatitis (NAFL), hepatitis B or C virus.

2.2.1. Role of BAs in hepatocarcinoma

Several evidences show that BAs may be implicated in liver tumorigenesis. Indeed, child with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC type 2) is predisposed to hepatocellular carcinoma [44]. This pathology is characterized by a genetic deficiency of the canalicular bile salt export pump BSEP or ABCB11,

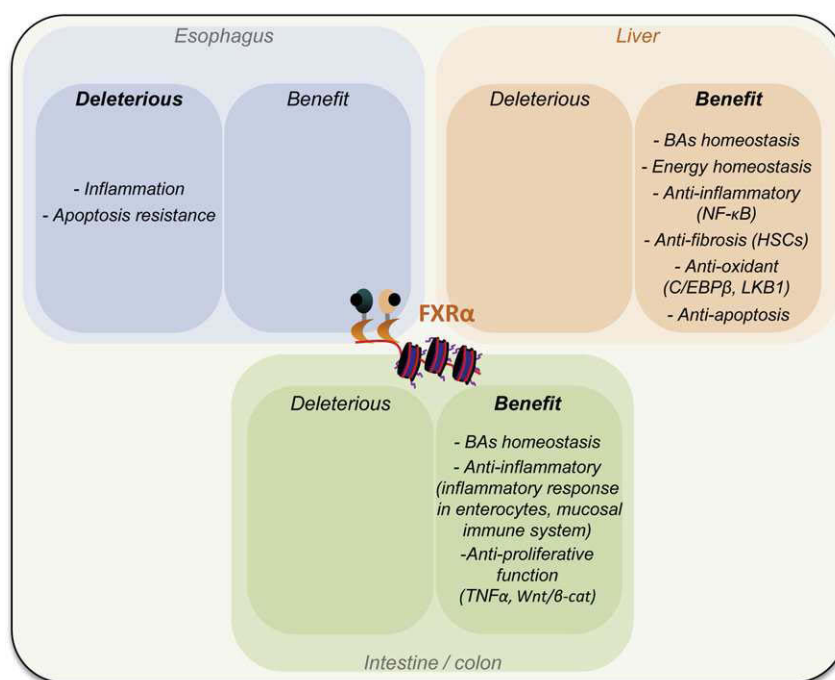


Fig. 5. Impacts of FXRα in gastro-intestinal cancers.

leading to severe cholestasis with elevated serum and liver BA levels, particularly CDCA and CA.

In vivo experiments on rats show that exogenous administration of DCA is a relatively strong promoter of the appearance of pre-neoplastic lesions in hepatocarcinogenesis [45,46]. In wild-type mice, a 0.2% CA-enriched diet strongly promoted *N*-nitrosodiethylamine-initiated carcinogenesis [47]. Furthermore a report highlights that, in rat, elevated BA concentrations in pathological conditions might act as endogenous promoters of hepatocarcinogenesis [48]. Several *in vitro* studies report evidences that BAs may affect directly

hepatocytes by inducing ROS production leading to DNA damage and apoptosis. Hydrophobic BAs like DCA, glucuro-CDCA or tauro-CDCA have been reported to generate ROS in rat hepatocytes, human hepatoma cell line or primary human hepatocytes [49–52]. Consistently, treatment of human hepatocarcinoma cells with DCA induces transcription of genes that respond to oxidative stress (NF-κB, c-fos, hsp70 and gadd153) or DNA damage (gadd153, hsp70 and c-fos) [53]. Moreover, several *in vitro* strategies using isolated rat hepatocytes, liver tissue sections or human hepatocarcinoma cell lines, show that BAs induce apoptosis in liver cells [54–56]. Among

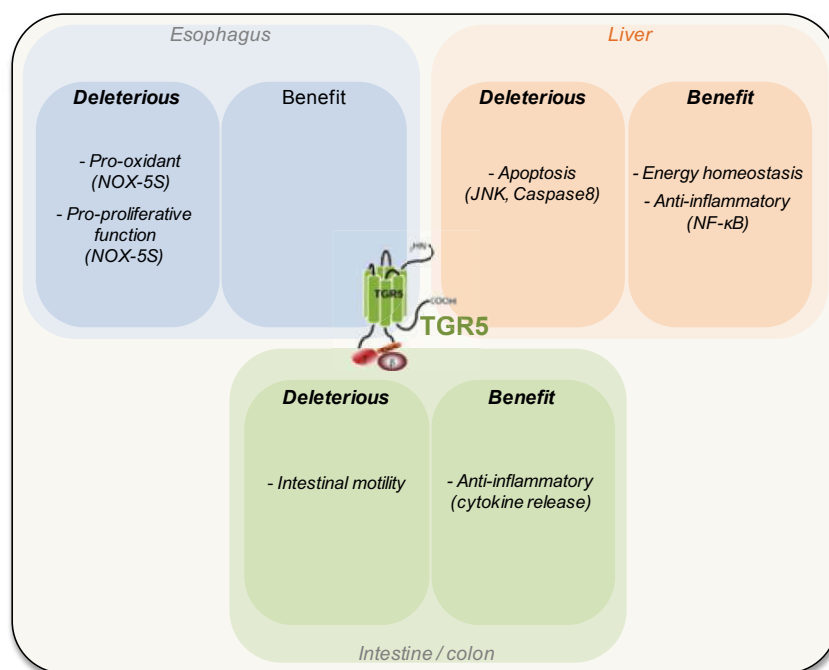


Fig. 6. Impacts of TGR5 in gastro-intestinal cancers.

them, three works on rats report that induction of apoptosis by BAs can be reduced by an anti-oxidant treatment like α -tocopherol or β -carotene suggesting that this event is caused by ROS production [51,57,58].

Even if the carcinogenic potential of BAs in liver is well established, the precise mechanisms by which they act remains unclear and involvement of their receptors FXR α and TGR5 are poorly understood.

2.2.2. Involvement of the nuclear receptor FXR α

2.2.2.1. FXR α : gatekeeper of BAs homeostasis in liver. FXR α plays a central role in the regulation of liver BAs homeostasis and their entero-hepatic circulation. This property is mainly due to the regulation of expression of gene involved in synthesis, conjugation and transport of BAs.

FXR α activation causes human BSEP up-regulation, the major excretion transporter of bile acids in hepatocytes [59]. Through a SHP-dependent pathway, FXR α decreases transcription of genes that control BAs synthesis like *Cyp7a1* [11] or *Cyp8b1* [60]. SHP also affects *Ntcp* expression, the sodium-dependent bile acid uptake carrier [61]. Furthermore, FXR α activation by CDCA enhances transcription of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) proteins leading to more hydrophilic and therefore less toxic BA glucuronides [62].

In addition, FXR α activation induces the ileal expression of fibroblast growth factor (FGF) 15 (FGF19 in human) [63]. Released into portal vein, this hormone binds its receptor FGFR4 in hepatocytes leading to *Cyp7a* repression and then decreased BA synthesis. As negative feed-back regulation of BA neosynthesis by FXR α -FGF15 axis is absent, FXR α null mice were shown to present an expanded BA pool [64].

This is also of particular interest as FGF19 was implicated in tumorigenesis. Indeed, FGF19-transgenic mice develop hepatocellular carcinoma (HCC) by 10–12 months. This is associated with an increased mitotic activity of hepatocytes. The mechanism by which FGF19 induces this tumorigenesis is not fully understood. However, through phosphorylation of GSK3 β , FGF19 allows β -catenin to accumulate in the nucleus for activation of genes involved in proliferation.

Although it is assumed that many, if not all, of the actions of FGF19 are the same as its mouse orthologous FGF15.

Thus, through its liver and intestinal functions, FXR α contributes to reduce accumulation of BAs in liver and thus to decrease their toxicity for hepatocytes.

2.2.2.2. FXR α maintains energy homeostasis in liver. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is one of the most important liver diseases in western countries characterized by triglyceride accumulation in hepatocytes. In connection with pathologies associated to metabolic syndrome as obesity, insulin resistance or type 2 diabetes mellitus, NAFLD could evolve to liver steatosis leading progressively to fibrosis, cirrhosis and by the end to hepatocellular carcinogenesis [4,65].

The involvement of FXR α in liver metabolism regulation was illustrated by FXR α inactivation in mice resulting in both triglyceride and cholesterol accumulation in liver [9]. Indeed, FXR α was shown to control lipid homeostasis in hepatocytes through negative SHP-dependant regulation of sterol-regulatory-element-binding protein 1c (SREBP1-c) and its target genes such as acetyl coa carboxylase (ACC) or FAS [14,66]. Additionally, FXR α activation by 6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid (6-ECDCA), a potent and selective semi-synthetic FXR α agonist, protects against liver steatosis in animal models [67].

Indirectly FXR α controls liver cholesterol accumulation by modulation of *Cyp7A1* expression, the rate-limiting enzyme responsible to cholesterol catabolism into bile acid [10,68].

Moreover, human CYP7A1 deficiency results in a statin-resistant hypercholesterolemia [69].

In addition, FXR α null mice also exhibit glucose intolerance and insulin insensitivity [70]. Furthermore, activation of FXR α was shown to decrease blood glucose levels in both diabetic db/db and wild-type mice [70]. In mouse and human hepatocytes, FXR α inhibits transcription of gluconeogenic genes such as G6P or PEPCK in a SHP-dependent manner [71,72].

According to its central role in regulation of both glucose and lipid metabolisms, FXR α prevents liver metabolic disorders and their potential to evolve into hepatocarcinoma.

2.2.2.3. FXR α shows anti-inflammatory property. Hepatic inflammation is closely linked to hepatocarcinogenesis [73,74]. The use of FXR α null mice demonstrates that liver inflammation is prior to development of spontaneous liver tumors since increased expression of genes involved in inflammation (interferon-gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-6, IL-1 β) were described before cancer development [47].

During liver pathological conditions such as cholestasis, inflammation has been mainly attributed to NF- κ B activation by hydrophobic BAs [75–77]. Interestingly, recent report demonstrates that FXR α negatively modulates NF- κ B-mediated hepatic inflammation [78].

Hepatic expression of the chimeric protein VP16FXR, a strong transcriptional activated form of FXR α , suppresses the lipopolysaccharide (LPS) induced expression of nitric oxide synthases [79], COX-2 and IFN- γ *in vivo* [78]. Moreover, *in vitro* experiments using human HepG2 cells and primary hepatocyte culture show that FXR α agonist inhibits NF- κ B transcriptional activity by decreasing its binding to DNA [78]. Furthermore it was demonstrated that NF- κ B reciprocally decreases FXR α transcriptional activity indicating a negative crosstalk between the FXR α and NF- κ B signaling pathways [78,80]. The mutual suppression between FXR α and NF- κ B might be an important mechanism to prevent carcinogenesis.

These data reveal that FXR α acts as a negative mediator of hepatic inflammation which may contribute to critical roles in hepatoprotection and suppression of hepatocarcinogenesis.

2.2.2.4. FXR α fights against fibrosis. Chronic liver fibrosis is associated with hepatocarcinogenesis. Interestingly, several clinical reports show that levels of FXR α expression and transcriptional activity decrease with fibrosis as the disease progresses to a severe grade [81]. Consistent with clinical data, histologic signs of liver fibrosis are observed in FXR α null mice [47,82].

Hepatic fibrosis has been shown to be the consequence of both increased of extracellular matrix (ECM) and reduced breakdown of ECM component [83,84]. Hepatic stellate cells (HSCs) are the major source of ECM in liver and can also participate to its degradation by the proteolytic enzyme like matrix metalloproteinase-2 (MMP) [85]. In mouse HSC culture, FXR α activation by 6-ECDCA leads to SHP-dependent inhibition of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) expression, a major MMP inhibitor [86]. On the other hand, TIMP-1 has been involved in both anti-apoptotic and proliferative pathways in HSCs. Thus, its inhibition enhances the susceptibility of HSCs to apoptogenic stimuli and decreases proliferation. Moreover, activation of the FXR α -SHP pathway, after administration of 6-ECDCA to cirrhotic rats, reduces liver fibrosis by increasing HSC apoptotic rate [86].

Thus, by limiting accumulation of HSCs and by promoting ECM degradation, FXR α protects liver from fibrosis and tumorigenesis.

2.2.2.5. FXR α acts as anti-oxidant factor. Experimental data from animal models and clinical data from patients with chronic liver infection suggest that an excess of ROS produced by inflammatory mediators facilitates the progression of liver fibrosis [87,88].

FXR α has been shown to play a role in the induction of genes encoding for proteins involved in anti-oxidant defense system [89–91]. Mice treated with CDCA show increased expression of anti-oxidant and xenobiotic enzymes due to CCAAT/enhancer binding protein β (C/EBP β) activation [92]. Moreover, in human hepatocyte derived cell line, FXR α activation by natural ligand CDCA or specific synthetic ligand, induces C/EBP β through AMPkinase-ERK1/2 pathway [92].

LKB1 belongs to kinase family and has been shown, through AMPK activation, to play a key role in protecting cells against mitochondrial dysfunction and ROS production [93]. In a recent study Lee et al. [94] report that FXR α activation by its specific ligand GW4064 increases level and activity of LKB1 both in hepatocyte culture and mouse liver by reducing levels of its post transcriptional inhibitor Mir-199a-3p.

Thus, by promoting C/EBP β and LKB1 functions, FXR α limits ROS induced injuries in hepatocytes and protects liver against fibrosis development and evolution to hepatocellular carcinoma.

2.2.2.6. FXR counteracts apoptosis. Chronic hepatocyte death is crucial for initiation and progression of liver fibrosis and cirrhosis [95]. As FXR α null mice exhibit strong cell apoptosis leading to fibrosis, FXR α was suggested to also protect liver cells from death [47]. In human hepatoma cell line HepG2, FXR α prevents serum deprivation-induced apoptosis through MAPK/ERK1/2 survival pathway [96]. *In vivo*, starved FXR α null mice present enhanced apoptosis compared to wild-type mice. This is associated to lower ERK1/2 phosphorylation status [96]. As discussed previously, FXR α was shown to inhibit the NF- κ B-mediated hepatic inflammatory response. Interestingly, FXR α activation has no negative effects on NF- κ B-activated anti-apoptotic genes, selectively maintaining NF- κ B cell survival response [78].

Thus, by suppressing cell apoptosis and selectively maintaining cell survival, FXR α plays an additional function in hepatoprotection.

2.2.3. TGR5 involvement

2.2.3.1. TGR5 gatekeeper of energy homeostasis in liver. TGR5 is well known for its roles in regulation of both energy homeostasis and glucose metabolism [19,97,98]. Through this, TGR5 is a potential target for the treatment of diabetes and associated metabolic disorders such as NAFL that could lead to liver carcinoma [19,20,97,99].

By inducing energy expenditure in brown adipose tissue (BAT), Watanabe et al. [19] report for the first time that TGR5 activation by BAs improves glucose tolerance and insulin sensitivity in fat-fed mice and prevents obesity. Furthermore, TGR5 was shown to promote mitochondrial oxidative phosphorylation and calcium influx in murine entero-endocrine cells which result in an increased secretion of GLP-1 [20], improving insulin secretion in pancreas cells [97,100].

Thus, by improving metabolic syndrome and then liver homeostasis TGR5 activation could participate indirectly to prevent hepatocellular carcinoma development.

2.2.3.2. TGR5 has anti-inflammatory property. Metabolic syndrome is associated with liver chronic inflammation, characterized by abnormal cytokine production and activation of inflammatory signaling pathways such as NF- κ B [101–103]. Using LPS-induced inflammation model, recent data show that TGR5 $^{-/-}$ mice exhibit a more severe inflammation and liver necrosis compared to wild-type mice [104]. These phenotypes were associated with elevated protein levels of NF- κ B target such as IL-1 β or IFN- γ . Moreover, as it was shown with FXR α , TGR5 activation by 23(S)-mCDCA treatment suppresses LPS-induced NF- κ B pathway in mouse liver [104].

Moreover, in rat isolated Kupffer cells, resident macrophages in liver, oleanolic acid or treatment with TGR5 specific agonist BR27 were shown to lower LPS-induced cytokine expression such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α [105].

Furthermore, the molecular mechanism by which TGR5 activation down regulates immune functions has been recently assessed. *In vitro* studies, carried both in mouse macrophages and in hepatocyte cell lines, show that TGR5 activation by 23(S)CDCA enhances interaction between β -arrestin2 and I κ B α thus reducing the phosphorylation of I κ B α by IKK and then abolishes NF- κ B translocation into nucleus [104]. In that line, Pols et al. have recently demonstrated *in vivo*, in mouse, that activation of TGR5 in macrophages by 6 α -ethyl-23(S)-methylcholic acid (6-EMCA, INT-777), a semi-synthetic BA, inhibits pro-inflammatory cytokine production via cAMP signaling and subsequent NF- κ B inhibition. The inhibition of atherosclerotic lesion was associated with decreased intraplaque inflammation and less plaque macrophage content [106].

These findings identify TGR5 as a negative mediator of NF- κ B transcriptional activity preventing chronic liver inflammation diseases.

2.2.3.3. TGR5 is involved in BA induced apoptosis. Pathological BA accumulation in liver causes hepatocyte injury by inducing apoptosis and thereby leads to progression of cholestatic liver disease to cancer [107–110].

Recently, Yang et al. [111] demonstrate the involvement of TGR5 activation in the mechanism of BA induced human hepatocyte apoptosis. Indeed, in hepatocyte cell line TGR5 stimulation was shown to promote c-Jun N-terminal kinases (JNK) activation and to reduce complex formation of JNK with caspase-8. This facilitates caspase-8 recruitment to death-inducing signaling complex (DISC) and induction of apoptosis signaling.

Even though, these data need to be confirmed, these observations suggest that, by inducing apoptosis in hepatocytes, TGR5 should also participate to the genesis and progression of liver diseases and then contribute to liver carcinogenesis.

2.2.4. Conclusion

Several evidences show that BAs may be implicated in liver carcinogenesis. FXR α acts at multiple levels highlighting its major roles to protect hepatocytes. FXR α reduces BAs accumulation in liver. It will also prevent liver metabolic disorders and their potential to evolve into hepatocarcinoma. Then FXR α acts as a negative mediator of hepatic inflammation and may contribute to critical roles in hepatoprotection and suppression of hepatocarcinogenesis. In addition, by limiting accumulation of HSC and by promoting ECM degradation, FXR α protects liver from fibrosis and tumorigenesis. Thus, by suppressing cell apoptosis and selectively maintaining cell survival, FXR α plays an additional function in hepatoprotection (Fig. 5).

In parallel, TGR5 mainly acts by improving metabolic syndrome and then liver homeostasis participating indirectly to prevent hepatocellular carcinoma development. Indeed, TGR5 is also defined as negative mediator NF- κ B transcriptional activity preventing chronic liver inflammation diseases. However, by inducing apoptosis in hepatocytes, TGR5 could promote genesis and progression of liver diseases and then contribute to liver carcinogenesis (Fig. 6).

2.3. Intestine/colon tumor

The estimated number of deaths from colonic cancer is 600 000 per year making it the fourth leading cause of cancer deaths [21]. The pathogenesis of colon cancer in humans is a multistep process involving both genetic and environmental factors. Among them,

dietary factors have been implicated in the majority of sporadic colorectal cancers.

Dietary fat intake appears to be one of the most powerful promoters in development and progression of colon cancer. While high fiber diet protects against carcinogenesis, several epidemiological studies link high consumption of red or processed meat, saturated fat intake and colonic cancer risk [112–116].

In rodents, *in vivo* experiments report that wild-type CB57Bl/6 mice fed a western diet, containing elevated lipids, develop colonic tumor [117]. Moreover, APC^{min/+} mice, predisposed among others to develop colon cancer, present an increased incidence of carcinoma and number of invasive tumors when they are fed a high fat diet [118,119].

2.3.1. Involvement of BAs in intestine/colon tumorigenesis

The potential role of BAs in enteric cancers is highlighted by the fact that people who consume western diet are more sensitive to colon cancer development and display increased fecal BA concentrations, mainly secondary BAs as DCA and LCA [120,121]. This suggest that exposure of colorectal epithelium to high concentrations of BAs appears to be an etiologic factor in colorectal carcinogenesis.

Several studies report that exposure of colon cells to BAs leads to ROS production that cause DNA damage, mutation or apoptosis. Indeed, hydrophobic acids, DCA and LCA, induce ROS in rodent colonic mucosa cell or in human adenocarcinoma cell lines like HCT-116 or CACO-2 [122–126]. In that line, numerous studies describe that secondary BAs induce DNA damage in colon cells consecutive to oxidative stress. Indeed, DCA treatment of human colon adenocarcinoma cells HCT-116 induces the expression of the DNA repair protein breast-cancer 1 (BRCA-1) [127] and DNA damage inducible gene GADD34/45/153 [128]. Moreover, major oxidative DNA damage, 8-OH-dG, increases in colon epithelial cells of DCA-fed mice for 8 months [123].

Next to this, a large number of reports shows that secondary BAs could also induce apoptosis in several human adenocarcinoma cell lines probably due to DNA damage accumulation [128–131].

Studies from other laboratories indicate a paradoxical proliferative action of BAs on cell lines. In human colon cancer cell line (H508 cells), taurine and glycine conjugates of LCA and DCA induce cell proliferation through the M3 muscarinic receptor-dependent pathway and transactivation of epidermal growth factor receptor (EGFR) [132]. Furthermore, low concentrations of DCA (5 and 50 μ M) significantly increase β -catenin activation and *cyclin-D1* expression and enhance colon cancer cell proliferation and invasiveness [133].

Thus, chronic exposure of colon epithelial cells to low concentrations of hydrophobic BAs can result in gene mutation and constitutive activation of pro-survival stress-response pathways. This could instigate cancer development. In line with this, DCA administration in a rat model of colonic carcinogenesis significantly increased the incidence of K-ras point mutation and proliferation index in colon tumors [134].

2.3.2. Is FXR α involved in this tumor?

2.3.2.1. FXR α : gatekeeper of BA homeostasis in intestine. As in hepatocytes, concentrations of BAs within enterocytes are tightly regulated in order to protect cells against BAs toxicity. In intestinal cells, FXR α activation decreases BA absorption by repressing the expression of human IBAT [135]. In line with this finding, FXR α –/– mice display enhanced intestinal BA absorption [64]. Furthermore, FXR α promotes BA transport through enterocytes and excretion into the portal system by enhancing respectively the expression of IBABP [64,136] and OST α/β in basolateral side [137,138].

Interestingly, it has been demonstrated that human and mouse vitamin-D nuclear receptor (VDR) can also bind LCA [139]. This

leads to the activation of a feed-back catabolic pathway that increases CYP3A expression and leads to detoxification of LCA. This suggests that another pathway involving a nuclear receptor could protect intestine from the potentially harmful effects of LCA.

Thus, by maintaining intestinal BA pool size FXR α /VDR play key role in preventing chronic injuries and inflammation that could lead to carcinogenesis.

2.3.2.2. FXR α fights against inflammation. Inflammatory bowel diseases have been shown to predispose to intestinal cancer development. Ulcerative colitis and Crohn's disease are typical chronic intestinal inflammation characterized by deregulations of mucosal immune system and bacterial overgrowth compromising intestinal epithelial barrier function and leading to systemic infection [140,141]. Interestingly, colon inflammation in patients with a Crohn's disease and in rodent models of colitis is associated with reduced expression of *Fxr α* mRNA providing evidence that FXR α may play a central role in protecting intestine against chronic injuries and forward carcinogenesis [142–144]. In addition, FXR α expression was inversely correlated to progression of human colorectal cancers and degree of malignancy of human colon cell lines [145].

Consistently, compromised intestinal architecture was observed in FXR α –/– mice. This seems to be related to an excessive immune response and high expression levels of IL-6, IL-1 β or TNF- α [47,82]. This phenotype appears to be independent of elevated BA concentrations observed in these mice since administration of cholestyramine does not modify their intestinal tumor susceptibility [47]. Last, FXR α deficiency results in increased sensitivity to tumorigenesis in both APC^{min/+} or azoxymethane (AOM)-induced colon carcinogenesis mouse models [146].

Moreover, FXR α activation decreases the severity of inflammation and improves colitis symptoms in several surgical or chemical murine colitis models. Bile duct ligation in mice induces colitis that could be reversed by GW4064 administration [147]. INT-747 treatment has been shown to prevent inflammation in animal models of dextran sodium sulfate (DSS) or trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis with preservation of the intestinal epithelial barrier function and reduction of goblet cell loss [148]. In addition, in mouse expression of microbicidal genes like Angiogenin1 (Ang1) was shown to be promoted after FXR α activation [147].

The ability of FXR α to regulate intestinal inflammation was described at several molecular levels including both anti-inflammatory response in enterocytes and functions of intestinal innate immunity [148].

2.3.2.2.1. FXR α activation controls inflammatory response in enterocytes. NF- κ B activation has been identified as a key factor in pro-inflammatory response to chronic intestinal diseases [149]. Consistent with described pro-carcinogen property of BAs, recent report reveals that DCA induces constitutive NF- κ B activation in human colon epithelial HCT-116 cells through multiple mechanisms involving, among others, the terminal mitochondrial respiratory complex IV [124].

In HT29 and Caco-2 human enterocyte cell lines, GW4064 treatment abolished the TNF- α -mediated induction of IL-1 β expression by decreasing NF- κ B transcriptional activity [148]. Moreover, FXR α target genes were repressed by pro-inflammatory stimuli and NF- κ B in enterocyte cell line or in *ex-vivo* ileal samples of mice [150]. The authors propose a physical interaction between NF- κ B and FXR α that may be involved in reciprocal repression for binding promoter sequences of their respective target genes.

2.3.2.2.2. FXR α activation controls mucosal immune system. In addition, FXR α agonist in activated immune cells negatively regulates inflammatory cytokine expression. Indeed, FXR α activation reduces inflammatory signaling in activated human peripheral

blood mononuclear cells, purified CD14 monocytes and dendritic cells, as well as in *lamina propria* mononuclear cells from patients with intestinal chronic inflammation [148]. Interestingly, in DSS or TNBS-induced colitis mice, FXR α agonist counteracts expression of pro-inflammatory genes such as TNF- α or IL-1 β , both NF- κ B transcriptional targets [148]. Moreover, addition of INT-747 significantly decreases TNF- α secretion in different mouse immune cell type such as monocytes or dendritic cells [144].

Recently, using mouse *Fxr*^{-/-} mice, Vavassori et al. describe a molecular mechanism whereby FXR α could inhibit immune function through NF- κ B transcriptional activity repression [144]. Indeed, treatment of LPS-activated macrophages with INT-747 results in stabilizing the nuclear co-repressor NCOR on the NF- κ B responsive element of the IL-1 β promoter. Thus, immune cell modulation by FXR α may be responsible for intestinal inflammation improvement.

By preventing cytokine expression, FXR α decreases the recruitment of an excess of inflammatory cells to the intestinal mucosa preserving barrier permeability. Furthermore, *in vitro* experiment suggests a direct role of FXR α in maintaining intestinal barrier integrity independently of its anti-inflammatory function. Indeed, FXR α activation protects against DSS-induced permeability in Caco-2 cell monolayer [148]. However the potential involvement of FXR α in controlling expression and localization of tight junction proteins remains unknown.

2.3.2.3. FXR α : from anti-inflammatory to anti-proliferative function. In addition, FXR α was shown to control enterocyte balance between proliferation and apoptosis. Two-month old FXR α null mice exhibit an expansion of basal proliferative intestinal compartment concomitantly with increased protein levels of β -catenine, c-myc and cyclin-D1 [146]. Furthermore, in nude mice, reactivation of FXR α in injected intestinal cancer cell increases apoptotic events, reduces proliferation and blocks growth of xenograft [151].

LS174T human colon adenocarcinoma cells infected with the chimeric protein VP16FXR α present increased mRNA levels of FXR α target gene *Shp* paralleled with increased expression of proapoptotic genes such as *Fas* or *Fadd* [151]. Moreover, decreased mRNA levels of anti-apoptotic *Bcl2* and pro-inflammatory gene *Tnf- α* were observed. In addition, GW4064 was able to activate apoptosis in both human colon HT29 cells and normal intestinal mucosa *in vivo* [151].

In mouse liver, TNF- α production by activated macrophages was shown to promote Wnt/ β -catenin signaling through inhibition of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), which may contribute to tumor development [152]. Thus, by repressing mucosal infiltration of activated macrophages and then TNF- α signaling, FXR α could contribute to decrease Wnt signaling in enterocytes and prevent proliferation and tumor development.

Consistent with decreased level of FXR α , data indicate that ileal expression of the FXR α target gene *Shp* is markedly lowered (50%) in patients with Crohn's colitis [150]. As it was described in human breast carcinoma and leukemia cell lines as well as in mouse embryonic cells, *Shp* suppresses cell proliferation and promotes apoptosis [153,154]. Inversely, loss of *Shp* expression inhibits 3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl]-3-chlorocinnamic acid (3-Cl-AHPC)-mediated apoptosis in both mouse and human cells [154]. Thus, by decreasing TNF- α production and promoting *Shp* expression, FXR α could maintain intestinal homeostasis and preserve from carcinogenesis.

2.3.3. Is there a role of TGR5 in intestinal diseases?

2.3.3.1. TGR5 shows anti-inflammatory function. Few are known about the role of TGR5 on the pathogenesis of human inflammatory

bowel disease. Recently, loss of function mutation of the *Tgr5* gene was associated with ulcerative colitis [155]. Conversely, Crohn's disease patients exhibited an increased expression of TGR5 compared to non-inflamed colon [67]. This observation was mainly attributed to excess recruitment of immune cells which express TGR5 in intestinal mucosa.

TGR5 null mice aged from 12 months present altered colonic histology with increased recruitment of mononuclear cells associated with disruption of intestinal barrier architecture and increased expression and mislocalisation of Zonula-occludens 1 (ZO1) [67].

In addition, systemic administration to mouse model of colitis of ciprofloxacin or oleanolic acid, both well characterized TGR5 agonists, protects against development of local signs of colonic inflammation and reduces expression of inflammatory mediators such as IL-6, TNF- α and IFN- γ [67].

In vitro studies have provided evidences that TGR5 exerts negative regulation of immune cells functions. BAs inhibit LPS-induced cytokine expression in Kupffer cells *via* TGR5-cAMP dependent pathways [105]. In RAW macrophage oleanolic acid leads to reduced TNF- α release [67].

Thus through regulation of immune function, TGR5 protects intestine from chronic inflammation and prevents carcinogenesis.

2.3.3.2. TGR5 and intestinal motility. In a recent study, Poole et al. [156] report that TGR5 is localized in the enteric nervous system prominently expressed by inhibitory motor neurons in both colon and proximal small intestine mediating the effects of BAs on intestinal motility. *In vivo*, luminal administration of DCA inhibits gastric emptying and small intestinal transit. Furthermore, DCA inhibits spontaneous phasic activity of isolated segments of ileum and colon induced by a neurogenic, cholinergic and nitrergic mechanism [156].

Alternatively, releasing GLP-1 from entero-endocrine L-cells, TGR5 activation leads indirectly to inhibition of proximal gut transit [157].

Thus TGR5 could play a role in increased exposure of intestinal mucosa to BA toxicity and then in inflammatory bowel disease and carcinogenesis.

2.3.4. Conclusion

By maintaining BA pool size in intestine, FXR α prevents chronic injuries and inflammation that could lead to carcinogenesis. In addition, the ability of FXR α to maintain intestinal homeostasis includes both control of inflammatory response in enterocytes and regulation of intestinal innate immunity functions. In addition and by this way, FXR α also controls the balance between proliferation and apoptosis of enterocytes. Moreover, FXR α preserves intestinal barrier permeability by decreasing recruitment of inflammatory cells to the intestinal mucosa (Fig. 5).

Regarding TGR5, it regulates immune function and protects intestine from chronic inflammation and prevents carcinogenesis. However, by inhibiting gastric emptying and small intestinal transit, TGR5 could increase exposure of intestinal mucosa to BA toxicity and then inducing inflammatory bowel disease and carcinogenesis (Fig. 6).

3. Conclusions and perspectives

BAs represent the main cholesterol catabolites. Their synthesis take place in liver and their entero-hepatic cycle importance has been known for decades. They ensure fat solubilization and emulsification and thus promote digestion.

In addition to this mechanical role, BAs have been described as signaling molecules. They act through the binding of two specific receptors: the nuclear receptor FXR α and the membrane receptor TGR5. The identification of these two receptors has recently opened

a new field of research in order to define if these receptors could be potential pharmacological targets. In this line, interesting data have been obtained *in vitro* or in rodent models suggesting that BA receptors could be targeted for pathologies such as diabetes and obesity. However, it is also important to explore their potential role in cancer development as altered BA concentrations have been associated with tumor process since many decades [158].

Within this review we report the involvement of BAs through both receptors in pathologies of the gastro-enteric tract and more precisely tumor development. The analyses of human data as well as *ex-vivo* and transgenic mouse models combined with pharmacological approaches help to define the exact role of BAs in these pathologies.

It is well known that BAs *per se* show detrimental effects due to their chemical properties (detergent) that can lead to DNA damages. However, through the activation of both receptors, BAs could have paradoxical activities depending on considered tissues (Figs. 5 and 6). Thus, if in esophagus FXR α might exert deleterious effects promoting inflammation and resistance to apoptosis, these effects are opposite in liver and intestine, where it counteracts cancer development. Concerning TGR5, if its high expression is associated to esophagus adenocarcinoma, it seems to have more complex roles in liver and intestine carcinogenesis.

If genetic predisposition seems to be involved like for many other diseases, lifestyle must play an important role on development of these cancers. Indeed, limiting fat and meat will maintain BA homeostasis lower and thus reduces their cell toxicity. Moreover, these studies are of major importance as they are dealing with pathologies whose incidences are increasing every year. Altogether this suggests that we need to clearly identify all the involved pathways activated by BAs through both FXR α and TGR5. It also highlights the complexity of the system as activation of a receptor could lead to both benefic and deleterious effects depending on the considered pathology.

Moreover, strategy to generate pharmacological drugs to treat diseases is even more difficult as these receptors are essential for normal physiology. Thus, it will not be as simple to specifically target one BA receptor rather than the other. Thus, we need to develop strategy to specifically act on one receptor in specific cell type. We will also need to take into consideration the patient history (genetic, environment, feeding habits...). Thus we might develop in the future personalized therapeutic. This is a challenging opened field for future research that will require to intercross chemical–physical–biological as well as clinical research areas.

References

- [1] R. Poupon, N. Chignard, O. Rosmorduc, V. Barbu, C. Housset. [Biliary function and its regulation], *Med. Sci. (Paris)* 20 (2004) 1096–1099.
- [2] D.W. Russell, The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis, *Annu. Rev. Biochem.* 72 (2003) 137–174.
- [3] J.M. Ridlon, D.J. Kang, P.B. Hylemon, Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria, *J. Lipid Res.* 47 (2006) 241–259.
- [4] L. Caballeria, M.A. Auladell, P. Toran, G. Pera, D. Miranda, A. Aluma, J.D. Casas, L. Munoz, C. Sanchez, A. Tibau, M. Birules, S. Canut, J. Bernad, J. Auba, M.M. Aizpurua, E. Alcaraz, Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in subjects from primary care units. A case-control study, *BMC Gastroenterol.* 8 (2008) 44.
- [5] W.A. Alrefai, R.K. Gill, Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications, *Pharm. Res.* 24 (2007) 1803–1823.
- [6] M. Trauner, J.L. Boyer, Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation, *Physiol. Rev.* 83 (2003) 633–671.
- [7] M. Makishima, A.Y. Okamoto, J.J. Repa, H. Tu, R.M. Learned, A. Luk, M.V. Hull, K.D. Lustig, D.J. Mangelsdorf, B. Shan, Identification of a nuclear receptor for bile acids, *Science* 284 (1999) 1362–1365.
- [8] R. Pellicciari, G. Costantino, E. Camaioni, B.M. Sadeghpour, A. Entrena, T.M. Willson, S. Fiorucci, C. Clerici, A. Gioiello, Bile acid derivatives as ligands of the Farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure-activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 4559–4569.
- [9] C.J. Sinal, M. Tohkin, M. Miyata, J.M. Ward, G. Lambert, F.J. Gonzalez, Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis, *Cell* 102 (2000) 731–744.
- [10] B. Goodwin, S.A. Jones, R.R. Price, M.A. Watson, D.D. McKee, L.B. Moore, C. Galardi, J.G. Wilson, M.C. Lewis, M.E. Roth, P.R. Maloney, T.M. Willson, S.A. Kliewer, A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis, *Mol. Cell* 6 (2000) 517–526.
- [11] J.Y. Chiang, R. Kimmel, C. Weinberger, D. Stroup, Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 10918–10924.
- [12] P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, B. Staels, Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 147–191.
- [13] T. Claudel, B. Staels, F. Kuipers, The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 2020–2030.
- [14] M. Watanabe, S.M. Houten, L. Wang, A. Moschetta, D.J. Mangelsdorf, R.A. Heyman, D.D. Moore, J. Auwerx, Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c, *J. Clin. Invest.* 113 (2004) 1408–1418.
- [15] K.R. Stayrook, K.S. Bramlett, R.S. Savkur, J. Ficorilli, T. Cook, M.E. Christe, L.F. Michael, T.P. Burris, Regulation of carbohydrate metabolism by the Farnesoid X receptor, *Endocrinology* 146 (2005) 984–991.
- [16] T. Maruyama, Y. Miyamoto, T. Nakamura, Y. Tamai, H. Okada, E. Sugiyama, T. Nakamura, H. Itadani, K. Tanaka, Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298 (2002) 714–719.
- [17] Y. Kawamura, R. Fujii, M. Hosoya, M. Harada, H. Yoshida, M. Miwa, S. Fukusumi, Y. Habata, T. Itoh, Y. Shintani, S. Hinuma, Y. Fujisawa, M. Fujino, A G protein-coupled receptor responsive to bile acids, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 9435–9440.
- [18] T. Maruyama, K. Tanaka, J. Suzuki, H. Miyoshi, N. Harada, T. Nakamura, Y. Miyamoto, A. Kanatani, Y. Tamai, Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice, *J. Endocrinol.* 191 (2006) 197–205.
- [19] M. Watanabe, S.M. Houten, C. Matak, M.A. Christoffolete, B.W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J.W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama, K. Schoonjans, A.C. Bianco, J. Auwerx, Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation, *Nature* 439 (2006) 484–489.
- [20] C. Thomas, A. Gioiello, L. Noriega, A. Strehle, J. Oury, G. Rizzo, A. Macchiarulo, H. Yamamoto, C. Matak, M. Pruzanski, R. Pellicciari, J. Auwerx, K. Schoonjans, TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis, *Cell Metab.* 10 (2009) 167–177.
- [21] A. Jemal, F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman, Global cancer statistics, *CA Cancer J. Clin.* 61 (2011) 69–90.
- [22] G.W. Falk, Barrett's esophagus, *Gastroenterology* 122 (2002) 1569–1591.
- [23] D. Coppola, R.C. Karl, Barrett's esophagus and Barrett's associated neoplasia: etiology and pathologic features, *Cancer Contr.* 6 (1999) 21–27.
- [24] D. Nehra, P. Howell, C.P. Williams, J.K. Pye, J. Beynon, Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity, *Gut* 44 (1999) 598–602.
- [25] M. Menges, M. Muller, M. Zeitz, Increased acid and bile reflux in Barrett's esophagus compared to reflux esophagitis, and effect of proton pump inhibitor therapy, *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 331–337.
- [26] J. Theisen, D. Nehra, D. Citron, J. Johansson, J.A. Hagen, P.F. Crookes, S.R. DeMeester, C.G. Bremner, T.R. DeMeester, J.H. Peters, Suppression of gastric acid secretion in patients with gastroesophageal reflux disease results in gastric bacterial overgrowth and deconjugation of bile acids, *J. Gastrointest. Surg.* 4 (2000) 50–54.
- [27] D. Nehra, P. Howell, J.K. Pye, J. Beynon, Assessment of combined bile acid and pH profiles using an automated sampling device in gastro-oesophageal reflux disease, *Br. J. Surg.* 85 (1998) 134–137.
- [28] K. Kono, A. Takahashi, H. Sugai, H. Iizuka, H. Fujii, Trypsin activity and bile acid concentrations in the esophagus after distal gastrectomy, *Dig. Dis. Sci.* 51 (2006) 1159–1164.
- [29] G. Towler, R. Shepherd, Application of Fishbein and Ajzen's expectancy-value model to understanding fat intake, *Appetite* 18 (1992) 15–27.
- [30] M. Fein, J.H. Peters, T.R. DeMeester, Carcinogenesis in reflux disease—in search for bile-specific effects, *Microsurgery* 27 (2007) 647–650.
- [31] K. Miwa, H. Sahara, M. Segawa, S. Kinami, T. Sato, I. Miyazaki, T. Hattori, Reflux of duodenal or gastro-duodenal contents induces esophageal carcinoma in rats, *Int. J. Cancer* 67 (1996) 269–274.
- [32] N.C. Guy, H. Garewal, H. Holubec, H. Bernstein, C.M. Payne, C. Bernstein, A.K. Bhattacharyya, K. Dvorak, A novel dietary-related model of esophagitis and Barrett's esophagus, a premalignant lesion, *Nutr. Cancer* 59 (2007) 217–227.
- [33] K.R. McQuaid, L. Laine, M.B. Fennerty, R. Souza, S.J. Spechler, Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34 (2011) 146–165.
- [34] A. De Gottardi, J.M. Dumonceau, F. Bruttin, A. Vonlaufen, I. Morard, L. Spahr, L. Rubbia-Brandt, J.L. Frossard, W.N. Dinjens, P.S. Rabinovitch, A. Hadengue, Expression of the bile acid receptor FXR in Barrett's esophagus and enhancement of apoptosis by guggulsterone *in vitro*, *Mol. Cancer* 5 (2006) 48.
- [35] A. van de Winkel, K.P. van Zoest, H. van Dekken, L.M. Moons, E.J. Kuipers, L.J. van der Laan, Differential expression of the nuclear receptors Farnesoid X

- receptor (FXR) and pregnane X receptor (PXR) for grading dysplasia in patients with Barrett's oesophagus, *Histopathology* 58 (2011) 246–253.
- [36] A. Capello, L.M. Moons, A. Van de Winkel, P.D. Siersema, H. van Dekken, E.J. Kuipers, J.G. Kusters, Bile acid-stimulated expression of the Farnesoid X receptor enhances the immune response in Barrett esophagus, *Am. J. Gastroenterol.* 103 (2008) 1510–1516.
 - [37] K. Dvorak, G.S. Watts, L. Ramsey, H. Holubec, C.M. Payne, C. Bernstein, G.J. Jenkins, R.E. Sampliner, A. Prasad, H.S. Garewal, H. Bernstein, Expression of bile acid transporting proteins in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma, *Am. J. Gastroenterol.* 104 (2009) 302–309.
 - [38] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, M. Locati, The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol.* 25 (2004) 677–686.
 - [39] C.J. van der Woude, P.L. Jansen, A.T. Tiebosch, A. Beuving, M. Homan, J.H. Kleibeuker, H. Moshage, Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype, *Hum. Pathol.* 33 (2002) 686–692.
 - [40] N. Katada, R.A. Hinder, T.C. Smyrk, N. Hirabayashi, G. Perdakis, R.J. Lund, T. Woodward, P.J. Klingler, Apoptosis is inhibited early in the dysplasia-carcinoma sequence of Barrett esophagus, *Arch. Surg.* 132 (1997) 728–733.
 - [41] K. Dvorakova, C.M. Payne, L. Ramsey, H. Bernstein, H. Holubec, M. Chavarria, C. Bernstein, R.E. Sampliner, C. Riley, A. Prasad, H. Garewal, Apoptosis resistance in Barrett's esophagus: ex vivo bioassay of live stressed tissues, *Am. J. Gastroenterol.* 100 (2005) 424–431.
 - [42] S. Shishodia, B.B. Aggarwal, Guggulsterone inhibits NF-kappaB and Ikappa-Balpha kinase activation, suppresses expression of anti-apoptotic gene products, and enhances apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 47148–47158.
 - [43] J. Hong, J. Behar, J. Wands, M. Resnick, L.J. Wang, R.A. DeLellis, D. Lambeth, R.F. Souza, S.J. Specbler, W. Cao, Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma, *Gut* 59 (2010) 170–180.
 - [44] A.S. Knisely, S.S. Strautnieks, Y. Meier, B. Stieger, J.A. Byrne, B.C. Portmann, L.N. Bull, L. Pawlikowska, B. Bilezikci, F. Ozcay, A. Laszlo, L. Tiszlavicz, L. Moore, J. Raftos, H. Arnell, B. Fischler, A. Nemeth, N. Papadogiannakis, J. Cielecka-Kuszyk, I. Jankowska, J. Pawlowska, H. Melin-Aldana, K.M. Emerick, P.F. Whittington, G. Mieli-Vergani, R.J. Thompson, Hepatocellular carcinoma in ten children under five years of age with bile salt export pump deficiency, *Hepatology* 44 (2006) 478–486.
 - [45] S. Kitazawa, [Studies on initiating activity of secondary bile acids for rat hepatocarcinogenesis], *Hokkaido Igaku Zasshi* 68 (1993) 110–120.
 - [46] R.G. Cameron, K. Imaida, H. Tsuda, N. Ito, Promotive effects of steroids and bile acids on hepatocarcinogenesis initiated by diethylnitrosamine, *Cancer Res.* 42 (1982) 2426–2428.
 - [47] F. Yang, X. Huang, T. Yi, Y. Yen, D.D. Moore, W. Huang, Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor Farnesoid X receptor, *Cancer Res.* 67 (2007) 863–867.
 - [48] H. Tsuda, T. Masui, K. Imaida, S. Fukushima, N. Ito, Promotive effect of primary and secondary bile acids on the induction of gamma-glutamyl transpeptidase-positive liver cell foci as a possible endogenous factor for hepatocarcinogenesis in rats, *Gann* 75 (1984) 871–875.
 - [49] C.M. Rodrigues, G. Fan, X. Ma, B.T. Kren, C.J. Steer, A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2790–2799.
 - [50] R.J. Sokol, B.M. Winkhofer-Roob, M.W. Devereaux, J.M. McKim Jr., Generation of hydroperoxides in isolated rat hepatocytes and hepatic mitochondria exposed to hydrophobic bile acids, *Gastroenterology* 109 (1995) 1249–1256.
 - [51] B. Yerushalmi, R. Dahl, M.W. Devereaux, E. Gumprecht, R.J. Sokol, Bile acid-induced rat hepatocyte apoptosis is inhibited by antioxidants and blockers of the mitochondrial permeability transition, *Hepatology* 33 (2001) 616–626.
 - [52] K.P. Tan, M. Yang, S. Ito, Activation of nuclear factor (erythroid-2 like) factor 2 by toxic bile acids provokes adaptive defense responses to enhance cell survival at the emergence of oxidative stress, *Mol. Pharmacol.* 72 (2007) 1380–1390.
 - [53] H. Bernstein, C.M. Payne, C. Bernstein, J. Schneider, S.E. Beard, C.L. Crowley, Activation of the promoters of genes associated with DNA damage, oxidative stress, ER stress and protein misfolding by the bile salt, deoxycholate, *Toxicol. Lett.* 108 (1999) 37–46.
 - [54] L. Qiao, E. Studer, K. Leach, R. McKinstry, S. Gupta, R. Decker, R. Kukreja, K. Valerie, P. Nagarkatti, W. El Deiry, J. Molkentin, R. Schmidt-Ullrich, P.B. Fisher, S. Grant, P.B. Hylemon, P. Dent, Deoxycholic acid (DCA) causes ligand-independent activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and FAS receptor in primary hepatocytes: inhibition of EGFR/mitogen-activated protein kinase-signaling module enhances DCA-induced apoptosis, *Mol. Biol. Cell* 12 (2001) 2629–2645.
 - [55] P. Kwo, T. Patel, S.F. Bronk, G.J. Gores, Nuclear serine protease activity contributes to bile acid-induced apoptosis in hepatocytes, *Am. J. Physiol.* 268 (1995) G613–G621.
 - [56] H. Higuchi, J.H. Yoon, A. Grambihler, N. Werneburg, S.F. Bronk, G.J. Gores, Bile acids stimulate cFLIP phosphorylation enhancing TRAIL-mediated apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 454–461.
 - [57] T. Patel, G.J. Gores, Inhibition of bile-salt-induced hepatocyte apoptosis by the antioxidant lazaroid U83836E, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142 (1997) 116–122.
 - [58] E. Gumprecht, R. Dahl, M.W. Devereaux, R.J. Sokol, Beta-carotene prevents bile acid-induced cytotoxicity in the rat hepatocyte: evidence for an antioxidant and anti-apoptotic role of beta-carotene in vitro, *Pediatr. Res.* 55 (2004) 814–821.
 - [59] M. Ananthanarayanan, N. Balasubramanian, M. Makishima, D.J. Mangelsdorf, F.J. Suchy, Human bile salt export pump promoter is transactivated by the Farnesoid X receptor/bile acid receptor, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 28857–28865.
 - [60] Y. Yang, M. Zhang, G. Eggertsen, J.Y. Chiang, On the mechanism of bile acid inhibition of rat sterol 12alpha-hydroxylase gene (CYP8B1) transcription: roles of alpha-fetoprotein transcription factor and hepatocyte nuclear factor 4alpha, *Biochim. Biophys. Acta* 1583 (2002) 63–73.
 - [61] L.A. Denson, E. Sturm, W. Echevarria, T.L. Zimmerman, M. Makishima, D.J. Mangelsdorf, S.J. Karpen, The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp, *Gastroenterology* 121 (2001) 140–147.
 - [62] O. Barbier, I.P. Torra, A. Sirvent, T. Claudel, C. Blanquart, D. Duran-Sandoval, F. Kuipers, V. Kosykh, J.C. Fruchart, B. Staels, FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity, *Gastroenterology* 124 (2003) 1926–1940.
 - [63] T. Inagaki, M. Choi, A. Moschetta, L. Peng, C.L. Cummins, J.G. McDonald, G. Luo, S.A. Jones, B. Goodwin, J.A. Richardson, R.D. Gerard, J.J. Repa, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis, *Cell Metab.* 2 (2005) 217–225.
 - [64] T. Kok, C.V. Hulzebos, H. Wolters, R. Havinga, L.B. Agellon, F. Stellaard, B. Shan, M. Schwarz, F. Kuipers, Enterohepatic circulation of bile salts in Farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 41930–41937.
 - [65] G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda, M. Rizzetto, Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome, *Hepatology* 37 (2003) 917–923.
 - [66] J.D. Horton, J.L. Goldstein, M.S. Brown, SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1125–1131.
 - [67] S. Cipriani, A. Mencarelli, M.G. Chini, E. Distrutti, B. Renga, G. Bifulco, F. Baldelli, A. Donini, S. Fiorucci, The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis, *PLoS One* 6 (2010) e25637.
 - [68] T.T. Lu, M. Makishima, J.J. Repa, K. Schoonjans, T.A. Kerr, J. Auwerx, D.J. Mangelsdorf, Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors, *Mol. Cell* 6 (2000) 507–515.
 - [69] C.R. Rivera, S.J. Mulvihill, M.J. Malloy, J.P. Kane, Human cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 109–117.
 - [70] Y. Zhang, F.Y. Lee, G. Barrera, H. Lee, C. Vales, F.J. Gonzalez, T.M. Willson, P.A. Edwards, Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1006–1011.
 - [71] K. Yamagata, H. Daitoku, Y. Shimamoto, H. Matsuzaki, K. Hirota, J. Ishida, A. Fukamizu, Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 23158–23165.
 - [72] K. Ma, P.K. Saha, L. Chan, D.D. Moore, Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1102–1109.
 - [73] A.B. Rogers, J.G. Fox, Inflammation and Cancer. I. Rodent models of infectious gastrointestinal and liver cancer, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286 (2004) G361–G366.
 - [74] W.E. Naugler, T. Sakurai, S. Kim, S. Maeda, K. Kim, A.M. Elsharkawy, M. Karin, Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production, *Science* 317 (2007) 121–124.
 - [75] M.K. Li, J.M. Crawford, The pathology of cholestasis, *Semin. Liver Dis.* 24 (2004) 21–42.
 - [76] S.A. Shah, Y. Volkov, Q. Arfin, M.M. Abdel-Latif, D. Kelleher, Ursodeoxycholic acid inhibits interleukin 1 beta [corrected] and deoxycholic acid-induced activation of NF-kappaB and AP-1 in human colon cancer cells, *Int. J. Cancer* 118 (2006) 532–539.
 - [77] G.J. Jenkins, K. Harries, S.H. Doak, A. Wilmes, A.P. Griffiths, J.N. Baxter, J.M. Parry, The bile acid deoxycholic acid (DCA) at neutral pH activates NF-kappaB and induces IL-8 expression in oesophageal cells in vitro, *Carcinogenesis* 25 (2004) 317–323.
 - [78] Y.D. Wang, W.D. Chen, M. Wang, D. Yu, B.M. Forman, W. Huang, Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response, *Hepatology* 48 (2008) 1632–1643.
 - [79] T. Tanaka, T. Uchiumi, E. Hinoshita, A. Inokuchi, S. Toh, M. Wada, H. Takano, K. Kohno, M. Kuwano, The human multidrug resistance protein 2 gene: functional characterization of the 5'-flanking region and expression in hepatic cells, *Hepatology* 30 (1999) 1507–1512.
 - [80] M.S. Kim, J. Shigenaga, A. Moser, K. Feingold, C. Grunfeld, Repression of Farnesoid X receptor during the acute phase response, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8988–8995.
 - [81] A. Wolfe, A. Thomas, G. Edwards, R. Jaseja, G.L. Guo, U. Apte, Increased activation of the Wnt/beta-catenin pathway in spontaneous hepatocellular carcinoma observed in Farnesoid X receptor knockout mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 338 (2011) 12–21.
 - [82] I. Kim, K. Morimura, Y. Shah, Q. Yang, J.M. Ward, F.J. Gonzalez, Spontaneous hepatocarcinogenesis in Farnesoid X receptor-null mice, *Carcinogenesis* 28 (2007) 940–946.

- [83] D.A. Mann, D.E. Smart, Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation, *Gut* 50 (2002) 891–896.
- [84] S.L. Friedman, Liver fibrosis – from bench to bedside, *J. Hepatol.* 38 (Suppl. 1) (2003) S38–S53.
- [85] M.J. Arthur, Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 (2000) G245–G249.
- [86] S. Fiorucci, G. Rizzo, E. Antonelli, B. Renga, A. Mencarelli, L. Riccardi, S. Orlandi, M. Pruzanski, A. Morelli, R. Pellicciari, A Farnesoid X receptor-small heterodimer partner regulatory cascade modulates tissue metalloproteinase inhibitor-1 and matrix metalloproteinase expression in hepatic stellate cells and promotes resolution of liver fibrosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 314 (2005) 584–595.
- [87] Y. Nakamoto, S. Kaneko, Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury, *Curr. Mol. Med.* 3 (2003) 537–544.
- [88] T. Kitada, S. Seki, S. Iwai, T. Yamada, H. Sakaguchi, K. Wakasa, In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease, *J. Hepatol.* 35 (2001) 613–618.
- [89] B.L. Urquhart, R.G. Tirona, R.B. Kim, Nuclear receptors and the regulation of drug-metabolizing enzymes and drug transporters: implications for inter-individual variability in response to drugs, *J. Clin. Pharmacol.* 47 (2007) 566–578.
- [90] W. Huang, K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, D.D. Moore, Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration, *Science* 312 (2006) 233–236.
- [91] F.Y. Lee, T.Q. de Aguiar Vallim, H.K. Chong, Y. Zhang, Y. Liu, S.A. Jones, T.F. Osborne, P.A. Edwards, Activation of the Farnesoid X receptor provides protection against acetaminophen-induced hepatic toxicity, *Mol. Endocrinol.* 24 (2010) 1626–1636.
- [92] K. Noh, Y.M. Kim, Y.W. Kim, S.G. Kim, Farnesoid X receptor activation by chenodeoxycholic acid induces detoxifying enzymes through AMP-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated phosphorylation of CCAAT/enhancer binding protein beta, *Drug Metab. Dispos.* 39 (2011) 1451–1459.
- [93] R.J. Shaw, K.A. Lamia, D. Vasquez, S.H. Koo, N. Bardeesy, R.A. Depinho, M. Montminy, L.C. Cantley, The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin, *Science* 310 (2005) 1642–1646.
- [94] C.G. Lee, Y.W. Kim, E.H. Kim, Z. Meng, W. Huang, S.J. Hwang, S.G. Kim, Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1, *Gastroenterology* 142 (2012). 1206.e7–1217.e7.
- [95] F. Farinati, R. Cardin, M. Fiorentino, A. D'Errico, W. Grigioni, A. Cecchetto, R. Naccarato, Imbalance between cytoproliferation and apoptosis in hepatitis C virus related chronic liver disease, *J. Viral Hepat.* 8 (2001) 34–40.
- [96] Y.D. Wang, F. Yang, W.D. Chen, X. Huang, L. Lai, B.M. Forman, W. Huang, Farnesoid X receptor protects liver cells from apoptosis induced by serum deprivation in vitro and fasting in vivo, *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 1622–1632.
- [97] C. Thomas, J. Auwerx, K. Schoonjans, Bile acids and the membrane bile acid receptor TGR5—connecting nutrition and metabolism, *Thyroid* 18 (2008) 167–174.
- [98] H. Sato, C. Genet, A. Strehle, C. Thomas, A. Lobstein, A. Wagner, C. Mioskowski, J. Auwerx, R. Saladin, Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 793–798.
- [99] S. Fiorucci, A. Mencarelli, G. Palladino, S. Cipriani, Bile-acid-activated receptors: targeting TGR5 and Farnesoid-X-receptor in lipid and glucose disorders, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 570–580.
- [100] E.P. Rafferty, A.R. Wyllie, K.H. Hand, C.E. Elliott, D.J. Grieve, B.D. Green, Investigating the effects of physiological bile acids on GLP-1 secretion and glucose tolerance in normal and GLP-1R(-/-) mice, *Biol. Chem.* 392 (2011) 539–546.
- [101] E. Pikarsky, R.M. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gukovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature* 431 (2004) 461–466.
- [102] M. Karin, F.R. Greten, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 749–759.
- [103] G.S. Hotamisligil, Inflammation and metabolic disorders, *Nature* 444 (2006) 860–867.
- [104] Y.D. Wang, W.D. Chen, D. Yu, B.M. Forman, W. Huang, The G-Protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor kappa light-chain enhancer of activated B cells (NF-kappaB) in mice, *Hepatology* 54 (2011) 1421–1432.
- [105] V. Keitel, M. Donner, S. Winandy, R. Kubitz, D. Haussinger, Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372 (2008) 78–84.
- [106] T.W. Pols, M. Nomura, T. Harach, G. Lo Sasso, M.H. Oosterweert, C. Thomas, G. Rizzo, A. Gioiello, L. Adorini, R. Pellicciari, J. Auwerx, K. Schoonjans, TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading, *Cell Metab.* 14 (2012) 747–757.
- [107] T. Patel, G.J. Gores, Apoptosis and hepatobiliary disease, *Hepatology* 21 (1995) 1725–1741.
- [108] T. Patel, L.R. Roberts, B.A. Jones, G.J. Gores, Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview, *Semin. Liver Dis.* 18 (1998) 105–114.
- [109] C. Rust, G.J. Gores, Apoptosis and liver disease, *Am. J. Med.* 108 (2000) 567–574.
- [110] J.H. Yoon, G.J. Gores, Death receptor-mediated apoptosis and the liver, *J. Hepatol.* 37 (2002) 400–410.
- [111] J.I. Yang, J.H. Yoon, S.J. Myung, G.Y. Gwak, W. Kim, G.E. Chung, S.H. Lee, S.M. Lee, C.Y. Kim, H.S. Lee, Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361 (2007) 156–161.
- [112] K. Wakai, K. Hirose, K. Matsuo, H. Ito, K. Kuriki, T. Suzuki, T. Kato, T. Hirai, Y. Kanemitsu, K. Tajima, Dietary risk factors for colon and rectal cancers: a comparative case-control study, *J. Epidemiol.* 16 (2006) 125–135.
- [113] A. Chao, M.J. Thun, C.J. Connell, M.L. McCullough, E.J. Jacobs, W.D. Flanders, C. Rodriguez, R. Sinha, E.E. Calle, Meat consumption and risk of colorectal cancer, *JAMA* 293 (2005) 172–182.
- [114] J.A. Meyerhardt, D. Niedzwiecki, D. Hollis, L.B. Saltz, F.B. Hu, R.J. Mayer, H. Nelson, R. Whittom, A. Hantel, J. Thomas, C.S. Fuchs, Association of dietary patterns with cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer, *JAMA* 298 (2007) 754–764.
- [115] M.L. Slattery, K.M. Boucher, B.J. Caan, J.D. Potter, K.N. Ma, Eating patterns and risk of colon cancer, *Am. J. Epidemiol.* 148 (1998) 4–16.
- [116] M.L. Slattery, J.D. Potter, D.M. Duncan, T.D. Berry, Dietary fats and colon cancer: assessment of risk associated with specific fatty acids, *Int. J. Cancer* 73 (1997) 670–677.
- [117] H.L. Newmark, K. Yang, N. Kurihara, K. Fan, L.H. Augenlicht, M. Lipkin, Western-style diet-induced colonic tumors and their modulation by calcium and vitamin D in C57Bl/6 mice: a preclinical model for human sporadic colon cancer, *Carcinogenesis* 30 (2009) 88–92.
- [118] K. Yang, W. Edelmann, K. Fan, K. Lau, D. Leung, H. Newmark, R. Kucherlapati, M. Lipkin, Dietary modulation of carcinoma development in a mouse model for human familial adenomatous polyposis, *Cancer Res.* 58 (1998) 5713–5717.
- [119] K.A. Baltgalvis, F.G. Berger, M.M. Pena, J.M. Davis, J.A. Carson, The interaction of a high-fat diet and regular moderate intensity exercise on intestinal polyp development in *Apc Min/+* mice, *Cancer Prev. Res. (Phila)* 2 (2009) 641–649.
- [120] A. Bajor, P.G. Gillberg, H. Abrahamsson, Bile acids: short and long term effects in the intestine, *Scand. J. Gastroenterol.* 45 (2010) 645–664.
- [121] D.H. Stamp, Three hypotheses linking bile to carcinogenesis in the gastrointestinal tract: certain bile salts have properties that may be used to complement chemotherapy, *Med. Hypotheses* 59 (2002) 398–405.
- [122] P.A. Craven, J. Pfanstiel, F.R. deRubertis, Role of reactive oxygen in bile salt stimulation of colonic epithelial proliferation, *J. Clin. Invest.* 77 (1986) 850–859.
- [123] H. Bernstein, H. Holubec, C. Bernstein, N. Ignatenko, E. Gerner, K. Dvorak, D. Besselsen, L. Ramsey, M. Dall'Agnol, K.A. Blohm-Mangone, J. Padilla-Torres, H. Cui, H. Garewal, C.M. Payne, Unique dietary-related mouse model of colitis, *Inflamm. Bowel Dis.* 12 (2006) 278–293.
- [124] C.M. Payne, C. Weber, C. Crowley-Skillicorn, K. Dvorak, H. Bernstein, C. Bernstein, H. Holubec, B. Dvorakova, H. Garewal, Deoxycholate induces mitochondrial oxidative stress and activates NF-kappaB through multiple mechanisms in HCT-116 colon epithelial cells, *Carcinogenesis* 28 (2007) 215–222.
- [125] J.M. Longpre, G. Loo, Protection of human colon epithelial cells against deoxycholate by rottlerin, *Apoptosis* 13 (2008) 1162–1171.
- [126] M. Venturi, R.J. Hambly, B. Ginghammar, J.J. Rafter, I.R. Rowland, Genotoxic activity in human faecal water and the role of bile acids: a study using the alkaline comet assay, *Carcinogenesis* 18 (1997) 2353–2359.
- [127] D.F. Romagnolo, R.B. Chirnomas, J. Ku, B.D. Jeffy, C.M. Payne, H. Holubec, L. Ramsey, H. Bernstein, C. Bernstein, K. Kunke, A. Bhattacharyya, J. Warneke, H. Garewal, Deoxycholate, an endogenous tumor promoter and DNA damaging agent, modulates BRCA-1 expression in apoptosis-sensitive epithelial cells: loss of BRCA-1 expression in colonic adenocarcinomas, *Nutr. Cancer* 46 (2003) 82–92.
- [128] D. Qiao, E. Im, W. Qi, J.D. Martinez, Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1583 (2002) 108–116.
- [129] S. Yui, T. Saeki, R. Kanamoto, K. Iwami, Characteristics of apoptosis in HCT116 colon cancer cells induced by deoxycholic acid, *J. Biochem.* 138 (2005) 151–157.
- [130] S. Yui, R. Kanamoto, T. Saeki, Deoxycholic acid can induce apoptosis in the human colon cancer cell line HCT116 in the absence of Bax, *Nutr. Cancer* 60 (2008) 91–96.
- [131] B.W. Katona, S. Anant, D.F. Covey, W.F. Stenson, Characterization of enantiomeric bile acid-induced apoptosis in colon cancer cell lines, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3354–3364.
- [132] K. Cheng, J.P. Raufman, Bile acid-induced proliferation of a human colon cancer cell line is mediated by transactivation of epidermal growth factor receptors, *Biochem. Pharmacol.* 70 (2005) 1035–1047.
- [133] R. Pai, A.S. Tarnawski, T. Tran, Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness, *Mol. Biol. Cell* 15 (2004) 2156–2163.
- [134] H. Narahara, M. Tatsuta, H. Iishi, M. Baba, N. Uedo, N. Sakai, H. Yano, S. Ishiguro, K-ras point mutation is associated with enhancement by deoxycholic acid of colon carcinogenesis induced by azoxymethane, but not with its attenuation by all-trans-retinoic acid, *Int. J. Cancer* 88 (2000) 157–161.

- [135] E. Neimark, F. Chen, X. Li, B.L. Shneider, Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter, *Hepatology* 40 (2004) 149–156.
- [136] J. Grober, I. Zaghini, H. Fujii, S.A. Jones, S.A. Kliewer, T.M. Willson, T. Ono, P. Besnard, Identification of a bile acid-responsive element in the human ileal bile acid-binding protein gene. Involvement of the Farnesoid X receptor/9-cis-retinoic acid receptor heterodimer, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29749–29754.
- [137] J.F. Landrier, J.J. Eloranta, S.R. Vavricka, G.A. Kullak-Ublick, The nuclear receptor for bile acids, FXR, transactivates human organic solute transporter-alpha and -beta genes, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006) G476–G485.
- [138] A. Rao, J. Haywood, A.L. Craddock, M.G. Belinsky, G.D. Kruh, P.A. Dawson, The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 3891–3896.
- [139] M. Makishima, T.T. Lu, W. Xie, G.K. Whitfield, H. Domoto, R.M. Evans, M.R. Haussler, D.J. Mangelsdorf, Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor, *Science* 296 (2002) 1313–1316.
- [140] D.K. Podolsky, Inflammatory bowel disease, *N. Engl. J. Med.* 347 (2002) 417–429.
- [141] F.E. Ahmed, Role of genes, the environment and their interactions in the etiology of inflammatory bowel diseases, *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6 (2006) 345–363.
- [142] R.M. Nijmeijer, R.M. Gadaleta, S.W. van Mil, A.A. van Bodegraven, J.B. Crusius, G. Dijkstra, D.W. Hommes, D.J. de Jong, P.C. Stokkers, H.W. Verspaget, R.K. Weersma, C.J. van der Woude, J.M. Stapelbroek, M.E. Schipper, C. Wijmenga, K.J. van Erpecum, B. Oldenburg, Farnesoid X receptor (FXR) activation and FXR genetic variation in inflammatory bowel disease, *PLoS One* 6 (2011) e23745.
- [143] J. Jahnel, P. Fickert, C. Langner, C. Hogenauer, D. Silbert, J. Gumhold, A. Fuchsichler, M. Trauner, Impact of experimental colitis on hepatobiliary transporter expression and bile duct injury in mice, *Liver Int.* 29 (2009) 1316–1325.
- [144] P. Vavassori, A. Mencarelli, B. Renga, E. Distrutti, S. Fiorucci, The bile acid receptor FXR is a modulator of intestinal innate immunity, *J. Immunol.* 183 (2009) 6251–6261.
- [145] A. De Gottardi, F. Touri, C.A. Maurer, A. Perez, O. Maurhofer, G. Ventre, C.L. Bentzen, E.J. Niesor, J.F. Dufour, The bile acid nuclear receptor FXR and the bile acid binding protein IBABP are differently expressed in colon cancer, *Dig. Dis. Sci.* 49 (2004) 982–989.
- [146] R.R. Maran, A. Thomas, M. Roth, Z. Sheng, N. Esterly, D. Pinson, X. Gao, Y. Zhang, V. Ganapathy, F.J. Gonzalez, G.L. Guo, Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328 (2009) 469–477.
- [147] T. Inagaki, A. Moschetta, Y.K. Lee, L. Peng, G. Zhao, M. Downes, R.T. Yu, J.M. Shelton, J.A. Richardson, J.J. Repa, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 3920–3925.
- [148] R.M. Gadaleta, K.J. van Erpecum, B. Oldenburg, E.C. Willemsen, W. Renooij, S. Murzilli, L.W. Klomp, P.D. Siersema, M.E. Schipper, S. Danese, G. Penna, G. Laverny, L. Adorini, A. Moschetta, S.W. van Mil, Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease, *Gut* 60 (2011) 463–472.
- [149] G. Rogler, K. Brand, D. Vogl, S. Page, R. Hofmeister, T. Andus, R. Knuechel, P.A. Baeuerle, J. Scholmerich, V. Gross, Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa, *Gastroenterology* 115 (1998) 357–369.
- [150] R.M. Gadaleta, B. Oldenburg, E.C. Willemsen, M. Spit, S. Murzilli, L. Salvatore, L.W. Klomp, P.D. Siersema, K.J. van Erpecum, S.W. van Mil, Activation of bile salt nuclear receptor FXR is repressed by pro-inflammatory cytokines activating NF-kappaB signaling in the intestine, *Biochim. Biophys. Acta* 1812 (2011) 851–858.
- [151] S. Modica, S. Murzilli, L. Salvatore, D.R. Schmidt, A. Moschetta, Nuclear bile acid receptor FXR protects against intestinal tumorigenesis, *Cancer Res.* 68 (2008) 9589–9594.
- [152] K. Oguma, H. Oshima, M. Aoki, R. Uchio, K. Naka, S. Nakamura, A. Hirao, H. Saya, M.M. Taketo, M. Oshima, Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells, *EMBO J.* 27 (2008) 1671–1681.
- [153] M.I. Dawson, Z. Xia, G. Liu, M. Ye, J.A. Fontana, L. Farhana, B.B. Patel, S. Arumugarajah, M. Bhuiyan, X.K. Zhang, Y.H. Han, W.B. Stallcup, J. Fukushima, T. Mustelin, L. Tautz, Y. Su, D.L. Harris, N. Waleh, P.D. Hobbs, L. Jong, W.R. Chao, L.J. Schiff, B.P. Sani, An adamantyl-substituted retinoid-derived molecule that inhibits cancer cell growth and angiogenesis by inducing apoptosis and binds to small heterodimer partner nuclear receptor: effects of modifying its carboxylate group on apoptosis, proliferation, and protein-tyrosine phosphatase activity, *J. Med. Chem.* 50 (2007) 2622–2639.
- [154] L. Farhana, M.I. Dawson, M. Leid, L. Wang, D.D. Moore, G. Liu, Z. Xia, J.A. Fontana, Adamantyl-substituted retinoid-related molecules bind small heterodimer partner and modulate the Sin3A repressor, *Cancer Res.* 67 (2007) 318–325.
- [155] J.R. Hov, V. Keitel, J.K. Laerdahl, L. Spomer, E. Ellinghaus, A. ElSharawy, E. Melum, K.M. Boberg, T. Manke, T. Balschun, C. Schramm, A. Bergquist, T. Weismuller, D. Gotthardt, C. Rust, L. Henckaerts, C.M. Onnie, R.K. Weersma, M. Sterneck, A. Teufel, H. Runz, A. Stiehl, C.Y. Ponsioen, C. Wijmenga, M.H. Vatn, P.C. Stokkers, S. Vermeire, C.G. Mathew, B.A. Lie, U. Beuers, M.P. Manns, S. Schreiber, E. Schrupf, D. Haussinger, A. Franke, T.H. Karlsen, Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis, *PLoS One* 5 (2010) e12403.
- [156] D.P. Poole, C. Godfrey, F. Cattaruzza, G.S. Cottrell, J.G. Kirkland, J.C. Pelayo, N.W. Bunnett, C.U. Corvera, Expression and function of the bile acid receptor GpBAR1 (TGR5) in the murine enteric nervous system, *Neurogastroenterol. Motil.* 22 (2010) 814–825. e227–818.
- [157] M.A. Nauck, U. Niedereichholz, R. Ettler, J.J. Holst, C. Orskov, R. Ritzel, W.H. Schmiegel, Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans, *Am. J. Physiol.* 273 (1997) E981–E988.
- [158] B.S. Reddy, C.W. Martin, E.L. Wynder, Fecal bile acids and cholesterol metabolites of patients with ulcerative colitis, a high-risk group for development of colon cancer, *Cancer Res.* 37 (1977) 1697–1701.

Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? (review)

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH,

Cellular and Molecular Life Sciences, 2013

Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling?

Marine Baptissart · Aurelie Vega ·
Emmanuelle Martinot · Silvère Baron ·
Jean-Marc A. Lobaccaro · David H. Volle

Received: 21 November 2012 / Revised: 27 May 2013 / Accepted: 27 May 2013 / Published online: 20 June 2013
© Springer Basel 2013

Abstract Bile acids are cholesterol metabolites that have been extensively studied in recent decades. In addition to having ancestral roles in digestion and fat solubilization, bile acids have recently been described as signaling molecules involved in many physiological functions, such as glucose and energy metabolisms. These signaling pathways involve the activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor (FXR α) or of the G protein-coupled receptor TGR5. In this review, we will focus on the emerging role of FXR α , suggesting important functions for the receptor in steroid metabolism. It has been described that FXR α is expressed in the adrenal glands and testes, where it seems to control steroid production. FXR α also participates in steroid catabolism in the liver and interferes with the steroid signaling pathways in target tissues via crosstalk with

steroid receptors. In this review, we discuss the potential impacts of bile acid (BA), through its interactions with steroid metabolism, on glucose metabolism, sexual function, and prostate and breast cancers. Although several of the published reports rely on *in vitro* studies, they highlight the need to understand the interactions that may affect health. This effect is important because BA levels are increased in several pathophysiological conditions related to liver injuries. Additionally, BA receptors are targeted clinically using therapeutics to treat liver diseases, diabetes, and cancers.

Keywords FXR α · Bile acid · Steroids · Physiologic functions

M. Baptissart and A. Vega contributed equally to this work.

M. Baptissart · A. Vega · E. Martinot · S. Baron ·
J.-M. A. Lobaccaro · D. H. Volle (✉)
INSERM U1103, Génétique Reproduction et Développement
(GReD), Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP 80026,
63177 Aubière Cedex, France
e-mail: david.volle@inserm.fr

M. Baptissart · A. Vega · E. Martinot · S. Baron ·
J.-M. A. Lobaccaro · D. H. Volle
CNRS Unité Mixte de Recherche 6293, GReD, Université Blaise
Pascal, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France

M. Baptissart · A. Vega · E. Martinot · S. Baron ·
J.-M. A. Lobaccaro · D. H. Volle
Clermont Université, Université Blaise Pascal, BP 10448,
63000 Clermont-Ferrand, France

M. Baptissart · A. Vega · E. Martinot · S. Baron ·
J.-M. A. Lobaccaro · D. H. Volle
Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne,
63000 Clermont-Ferrand, France

Bile acids

Biosynthesis and physico-chemical function

Bile acids (BAs) are the main constituent of bile. BAs are present in the digestive tract during a meal and ensure solubilization and emulsification of fat, thus helping digestion [1]. They are produced in the liver from cholesterol through a series of enzymatic modifications. There are two different synthesis pathways that share common enzymes. The first, named the classical pathway, involves the P450 CYP7A1 and CYP8B1 cytochromes, among others. The alternate pathway involves cytochromes CYP27A1 and CYP7B1. Both pathways result in the production of the so-called primary BAs cholic acid (CA) and chenodeoxycholic (CDCA) [2]. Before being excreted by the hepatocytes, BAs are, in part, combined with amine residues (glycine or taurine) leading to the production of bile salt-, tauro-, or glyco-conjugates. Primary BAs and their conjugates are stored in the

gallbladder and are discharged during a meal into the duodenum to facilitate the digestion of fats and their passage through the enterocyte barrier.

In the ileum, BAs are partially deconjugated and are modified by enzymes of the intestinal flora [3]. These transformations lead to the synthesis of secondary BAs. Thus, deoxycholic acid (DCA) and lithocholic acid (LCA) are derived from CA and CDCA, respectively.

In the ileum and colon, the majority of BAs (95 %) are reabsorbed for recycling in the liver. Thus, the newly synthesized BAs will again be excreted during several rounds of digestion. This recycling mechanism, named enterohepatic circulation, involves a system of finely regulated carriers to maintain the homeostasis of BAs and cholesterol from which the BAs originate [4].

In addition to this mechanical function, BAs have been described as molecules that signal through two receptors: the nuclear farnesoid X receptor alpha (FXR α ; NR1H4) and the membrane receptor TGR5 (GPBAR1, G protein-coupled bile acid receptor).

Here, we will focus on the potential involvement of FXR α and bile acids on steroid metabolism.

The nuclear receptor of BAs: FXR α

FXR α is a member of the nuclear receptor family [5]. This receptor was isolated from mouse livers in a screen of proteins searching for proteins that interact with the receptor of 9-cis retinoic acid (RXR) and thus was previously named RXR-interacting protein 14 (RIP14) [6]. It was renamed FXR α because it was shown to be activated by farnesol, an intermediate of the mevalonate pathway. FXR α regulates transcription through heterodimerization with RXR, and binds specific sequences on the promoter of target genes, named the FXR-response elements (FXREs), to regulate transcription. These sequences are composed of two copies of a six-nucleotide sequence (AGGTCA) that are arranged as inverted repeat motifs separated by one base (IR-1) [7]. Other FXREs have been described, including IR0, IR8 (separated by zero or eight base pairs, respectively), ER8 (an everted repeat motif) and DR1 (a direct repeated motif), but these response elements have a lower affinity than IR-1. If the FXR α /RXR heterodimer enhances transcription, it seems as FXR α can also repress transcription through potentially negative FXREs [8–10].

FXR α has also been shown to bind to certain genes as a monomer or a homodimer on negative FXREs [11]. These mechanisms are not yet fully understood.

FXR α /RXR is a permissive heterodimer, as ligands of both partners can synergize to regulate the transcription of target genes. In 1999, BAs were identified as ligands of FXR α [12–14]. This led to the renaming of FXR α as a “bile acid receptor” (BAR). The preferred ligands of FXR α

are CDCA and its conjugated derivatives [15, 16]. Different bile acids have different potencies in regard to the activation of FXR α . The potencies are as follows, in decreasing order: (1) CDCA, (2) DCA, (3) LCA, (4) CA [13].

Human and mouse genes encode four isoforms of FXR α : FXR α 1 (RIP14-2), FXR α 2, FXR α 3 and FXR α 4 (RIP14-1) [17, 18]. The mouse FXR α gene is located on chromosome 10 C2, and the human FXR α gene is located on chromosome 12q23.1. These genes are composed of 11 exons and ten introns. The isoforms result from two alternate promoters that initiate transcription at either exon 1 or exon 3 [17, 19]. The alternative promoters at exon 1 or exon 3 regulate the expression of FXR α 1 and FXR α 2 or FXR α 3 and FXR α 4 transcripts, respectively. The FXR α 3 and FXR α 4 isoforms possess longer N-terminal regions than do FXR α 1 and FXR α 2. The isoform differences could impact the efficiency of the “activation function 1 domain” (AF-1) for interacting with cofactors. In the FXR α 1 and 3 isoforms, exon 5 is differentially spliced compared to FXR α 2 and 4. This alternative splicing event results in the addition of four amino acids (MYTG) adjacent to the DNA-binding domain in the hinge domain. The four FXR α isoforms present a degree of specificity at the mRNA level, which affects protein structure. However, all isoforms contain the classical domains of nuclear receptors, including the dimerization interface, the ligand binding domain, the DNA-binding domain, and the ligand-dependent activation function (AF-2) domain at the C-terminus. Indeed, the isoforms indicate classical activation by RXR and FXR α agonists, but could differentially regulate the expression of target genes in vitro [19, 20, 21]. Moreover, the isoforms are expressed in a tissue-specific manner.

The heart and adrenal glands express only FXR α 1 and FXR α 2. These isoforms are expressed at low levels in the lung and white adipose tissue. FXR α 3 and FXR α 4 are expressed in the kidney and stomach [22]. Volle et al. [23] showed the expression of FXR α in the testis, specifically in the interstitial compartment. This result was supported by a further study on testicular cell lines [24]. In humans, Bishop-Bailey et al. [25] showed expression of FXR α in biopsies of cardiac muscle, the small intestine and the adrenal glands. The liver and adrenal glands express FXR α 1 and FXR α 2 exclusively, while the kidney and the colon express FXR α 3 and FXR α 4. All four isoforms are found in the small intestine and duodenum. FXR α is detected in human immune cells, peripheral blood mononuclear cells and subsets of lymphocytes and monocytes [26, 27].

These expression patterns of FXR α suggest that it might have major physiological roles. The use of a mouse model lacking the gene encoding FXR α (FXR α ^{-/-}) highlights the involvement of FXR α in many physiological functions (digestion, immunity) and diseases, such as diabetes and cancers [28]. The first described roles of FXR α were the

regulation of the enterohepatic cycle and the regulation of BA biosynthesis [29]. *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice exhibit high plasma concentrations of BAs, highlighting the critical role of FXR α in the repression of *Cyp7a1*, which codes for a key enzyme in BA biosynthesis. At the molecular level, this pathway involves several members of the nuclear receptor superfamily, such as SHP (small heterodimer partner), LRH1 (Liver receptor homolog-1), and LXR α (Liver X receptor) [30, 31]. In parallel, FXR α protects the liver from the toxic effects of the accumulation of BAs, promoting the excretion of BAs into the bile by the transcriptional induction of specific transporter *Bsep* (bile salt export pump) [32]. *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice consistently show decreased excretion of BAs in the digestive tract [29]. In the intestine, FXR α induces the expression and secretion of fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19) into the portal circulation. After binding with the fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) in the liver, FGF15/19 represses the enzymes of BA synthesis [33].

FXR α is also involved in the control of lipid and carbohydrate metabolism [11]. Its action in the liver limits triglyceride production through the repression of genes such as stearoyl coenzyme A desaturase [34]. Consistently, *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice show high plasma triglyceride concentrations. In addition, FXR α also controls glucose metabolism through the regulation, in the liver, of phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase genes encoding key enzymes of gluconeogenesis and glycogenolysis [35].

Crosstalk between bile acids and steroid metabolism

In addition to the primary roles of bile acids, many recent studies have reported potential connections between bile acids and steroid metabolism.

It has recently been demonstrated that steroids can control bile acid homeostasis. For example, long-term therapy with glucocorticoids (GC) presents several limitations due to side effects such as hyperglycemia or insulin resistance. Cholestasis remains a major side effect. BA serum levels are correlated positively with serum GC concentrations in humans. Increased GC levels in Cushing's patients were associated with elevated BA levels [36]. Furthermore, hepatic GC receptor deficiency in mice resulted in a reduction of the hepatic BA pool in obese mice [37].

Similarly, estrogens are thought to contribute to the etiology of intrahepatic cholestasis during pregnancy, which is associated with an increase in the total bile acid pool [38]. This disease usually develops in the third trimester of pregnancy when concentrations of estrogens are the highest. These patients can develop cholestasis outside pregnancy when they are taking oral contraceptives containing 17 α ethinyloestradiol. High doses of estradiol and

its metabolites also cause cholestasis in rodents, and mice lacking estrogen receptors are resistant to these effects [39, 40].

In this review, we will discuss data indicating that bile acids can regulate steroid homeostasis and interfere with steroid signaling pathways through FXR α . This hypothesis relies on studies demonstrating that FXR α is expressed in many steroidogenic tissues. Moreover, bile acids, FXR α ligands, and steroids are derived from the same precursor molecule (cholesterol). Although several of the reported data rely on in vitro studies, they highlight the need to understand these interactions because they may affect health.

Impact of bile acids on glucocorticoid pathways

Glucocorticoids are produced by the adrenal glands and are essential for life. In humans, cortisol is the most important glucocorticoid (GC). The name of the GCs is based on their well-established roles in glucose metabolism during the stress response. GCs are involved in the stimulation of gluconeogenesis, particularly in the liver, the mobilization of amino acids from extrahepatic tissues, the inhibition of glucose uptake in muscle and adipose tissue, as well as the stimulation of fat breakdown in adipose tissue [41]. GCs regulate or support cardiovascular, metabolic, immunologic, and homeostatic functions. The adrenals also produce mineralocorticoids, mostly aldosterone. The main target of aldosterone is the distal tubule of the kidney, where it stimulates the exchange of sodium and potassium.

The potential role of FXR α in adrenals was expected as it was described to be highly expressed in the adrenocortical cells of the *zona fasciculata* [42, 43]. These potential interactions with GC metabolism could be either at the level of GC synthesis, catabolism, or either through the alteration of their physiological functions.

Glucocorticoid synthesis

As summarized in Fig. 1, the impact of FXR α on GC synthesis was recently demonstrated. *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice show the same plasma glucocorticoid concentrations as wild-type mice, suggesting that FXR α might not be involved in the regulation of the adrenal steroidogenesis under normal conditions. However, FXR α might have an impact in adrenal physiology in mice [44], as its activation increases the expression of scavenger receptor class B, member 1 (SR-BI), which is involved in the transport of cholesterol esters, the specific cellular cholesterol pool used for steroidogenesis [45]. C57BL6 female mice treated with GW4064, a synthetic FXR α agonist, have an increased plasma corticosteroid concentrations [46].

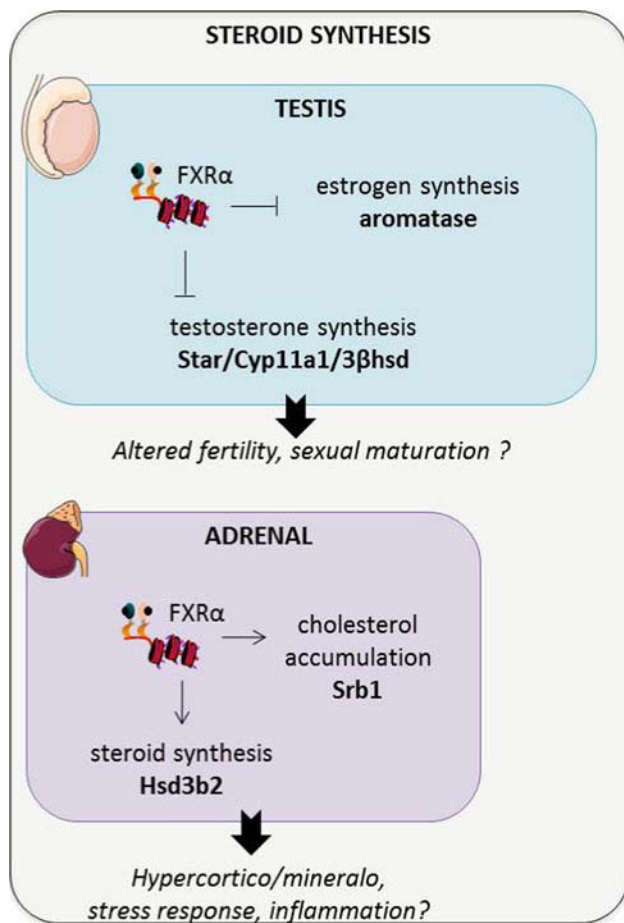


Fig. 1 Schematic representation of FXR α impact on steroid synthesis. In the testes, FXR α regulates the synthesis of both androgens and estrogens through the inhibition of the steroid acute regulatory proteins, cytochrome P450A1, 3 β -hydroxydehydrogenase, and aromatase. This effect can lead to altered male fertility or sexual maturation at puberty. In the adrenal glands, the impact of FXR α on steroid synthesis is mediated through the regulation of the Srb-1 gene, leading to increased cholesterol mobilization for steroid synthesis and regulation of 3 β -hydroxydehydrogenase type 2 in human adrenal cells. This effect can result in hypercorticosteroid or hypermineralocorticoid production and affects stress responses and inflammation

In the human adrenocortical cell line H295R, the use of GW4064 and CDCA shows that FXR α positively regulates the expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD3B2). This regulation does not exist in mice, which is consistent with the fact that no FXRE was identified in the mouse Hsd3 β 1 promoter region, the orthologue of human HSD3B2 gene [47].

Glucocorticoid catabolism

In target tissues, the concentration of steroids results from the equilibrium between synthesis and catabolism processes. The efficiency of GCs relies on an inactivation or a degradation of the steroids.

Cellular availability The ability of cells to respond to glucocorticoids and aldosterone is dependent on 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases (11 β HSDs), which catalyze the reversible conversion of physiologically active glucocorticoids to the inactive 11-ketometabolites. There are two isoforms of the 11 β -hydroxydehydrogenase: 11 β -HSD1 and 11 β -HSD2, and 11 β -HSD deficiency is responsible for the hypermineralocorticoid, which results in hypertension.

There is much evidence to suggest that bile acids are able to enhance the intracellular availability of cortisol by abrogating the 11 β -HSD2 activity. BA-dependent inhibition of 11 β HSD2 enzyme activity was demonstrated using total renal microsomes. Various BAs, such as CDCA and DCA, are able to inhibit the oxidative activity of 11 β HSD2. However, in vitro studies suggest that CDCA might affect the activity of 11 β -HSD2 in HEK-293 cells only at very high non-physiological concentrations. Consistently, the induction of cirrhosis by bile duct ligation decreased the transcriptional levels of the 11 β -HSD enzyme (Fig. 2). Inhibition of 11 β HSD2 may contribute to the sodium retention and potassium excretion observed in patients with liver cirrhosis or cholestasis [48, 49].

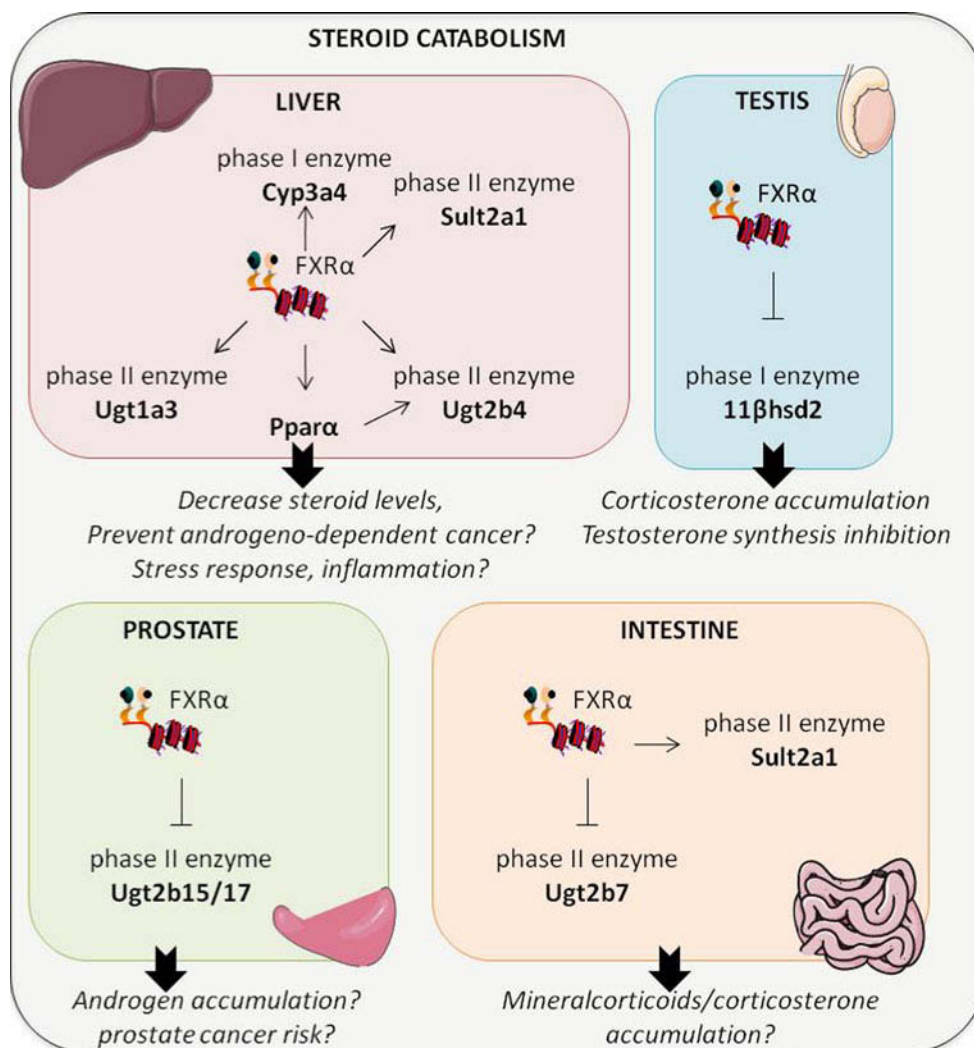
In agreement with reports showing that bile acids can inhibit both 11 β -HSD isoforms in various tissues, it was demonstrated that CDCA inhibited 11 β -HSD1 in Leydig cells [50]. It can be hypothesized that FXR α can regulate the impact of cortisol in Leydig cells through the regulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 (Fig. 2). It is well established that glucocorticoids play a critical role in the control of Leydig cell function. High levels of glucocorticoids are associated with a reduced circulating testosterone level and with reproductive dysfunction [51, 52]. It has been reported that excess corticosterone reduces the expression and activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) in adult rat Leydig cells in vivo and in vitro [53].

Glucocorticoid degradation Glucuronidation is catalyzed by enzymes belonging to the uridine 5, diphosphate glucuronosyl transferase family (UGT) [8, 54]. These enzymes have been divided into two major subfamilies, UGT1A and UGT2B, based on their amino acid sequence homology. The UGT2 family includes enzymes that are able to glucuronidate both bile acids and steroids.

Expressed in the liver, kidney, brain, and gastrointestinal tract, UGT2B7 is considered the major human mineralocorticoid and glucocorticoid metabolizing UGT enzyme (Fig. 2). It has also been demonstrated that a single mutation in this gene greatly affects the level of aldosterone glucuronidation.

Ugt2b7 expression seems to be repressed by LCA treatment in vitro. LCA-FXR α activation dramatically

Fig. 2 Schematic representation of FXR α impact on steroid catabolism. In the liver, FXR α participates in the homeostasis of steroids by regulating the expression of many genes involved in steroid metabolism, such as Cyp3a4, Sult2a1, Ugt1a3, and Ugt2b4. Ugt2b4 regulation can be either direct or through PPAR α . These types of regulation are also observed in the intestine (Sult2a1 and Ugt2b7). Modulating the local levels of mineralocorticoids and corticosteroids contributes to local inflammation processes. In the testis, the role of FXR α in BA repression of 11 β hsd is unclear, but it may contribute to the repression of testosterone synthesis by FXR α . In the prostate, the repression of Ugt2b15/17 expression by FXR α leads to androgen accumulation and an increased risk of prostate cancer development



decreased accumulation of *UGT2B7* mRNA levels through the binding of FXR α to a negative FXRE [55]. Moreover, transfection of cells with hFXR α resulted in a significant suppression of *UGT2B7* expression in the absence of LCA and additional suppression was observed when the cells were treated with LCA.

FXR α interferes with glucose metabolism regulation by glucocorticoid signaling pathways

Regarding the impact of FXR α on GCs synthesis and catabolism, it is reasonable to speculate that bile acids could contribute to a pathologically increased serum level of mineralocorticoids and glucocorticoids [56].

The action of glucocorticoids is mediated through the glucocorticoid receptor (GR), which is a member of the nuclear receptor superfamily that regulates numerous transcription programs including immune suppression, anti-inflammatory responses, and glucose metabolism.

Glucocorticoid binds to GR in the cytoplasm and promotes its translocation to the nucleus. Then, activated GR binds to a GR response element (GRE) in the promoter of downstream target genes and allows their transcription through the recruitment of various co-activators such as PGC-1.

GR is highly expressed in the liver, where it regulates the expression of rate-limiting enzymes in gluconeogenesis and plays an important role in the control of glucose metabolism. During conditions of high energy demand, systemic glucocorticoid concentrations increase and activate GR in the liver, leading to glucose mobilization via the expression of gluconeogenesis enzymes [57]. Among these enzymes, phospho(enol)pyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose-6-phosphatase (G6Pase) are known to be positively regulated by glucocorticoids and also by glucagon, which both have strong gluconeogenic actions, while insulin suppresses hepatic gluconeogenesis [58]. Conditional mice harboring a disrupted GR in hepatocytes exhibit profound hypoglycemia after prolonged food withdrawal and

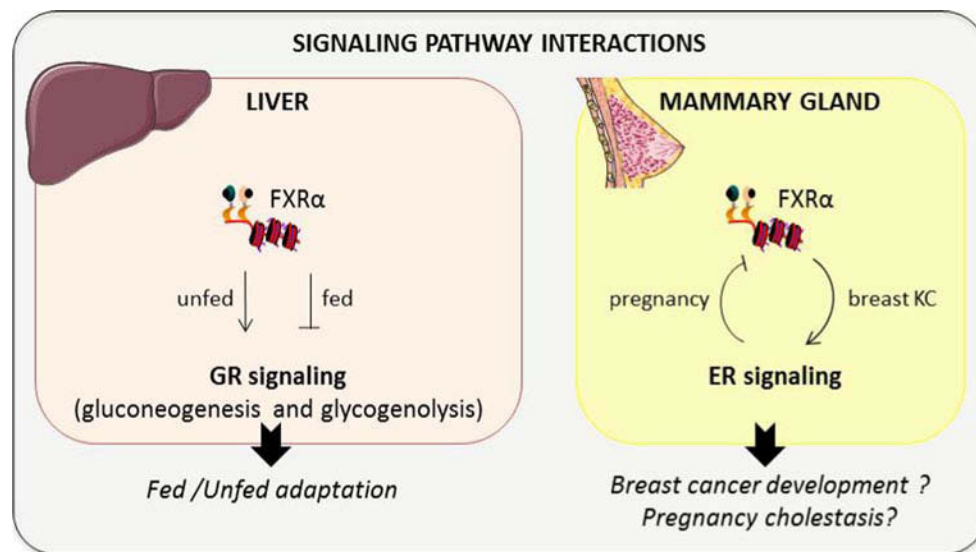


Fig. 3 Schematic representation of the crosstalk between steroids and FXR α signaling pathways. In the liver, the interaction of FXR α and glucocorticoid pathways is notably complex and can lead to either the induction or repression of this pathway. This process is correlated with fed/unfed adaptation processes. FXR α has a role in breast cancer.

are unable to up-regulate the expression of gluconeogenic enzymes [59].

Bile acids exert regulatory effects to maintain glucose and insulin homeostasis. However, the precise role of FXR α in the regulation of hepatic glucose metabolism remains controversial, as it was described either as an inhibitor or an inducer of gluconeogenesis [22, 60, 61] (Fig. 3).

FXR α represses gluconeogenesis Several studies report a repressive effect of FXR α on the expression of gluconeogenic genes, suggesting that FXR α signaling could interfere with/counteract the role of glucocorticoids and GR signaling on hepatic glucose metabolism. C57BL/6 mice treated with a 1 % CA-supplemented diet for 7–8 days showed decreased hepatic *Pepck* and *G6Pase* mRNA levels [62, 63]. The involvement of FXR α in *Pepck* and *G6Pase* downregulation was suggested in vivo by Zhang et al. [64], showing that oral GW4064 treatment, as well as adenoviral-mediated hepatic overexpression of FXR α , improved hyperglycemia in db/db diabetic mice. Feeding a CA-enriched diet has been shown to decrease fasting blood glucose levels associated with reduced expression of *Pepck* and *G6Pase* mRNA in wild-type but not *Fxr* α ^{-/-} mice. This effect was shown to be mediated through the classical FXR α target gene *Shp*, a known regulator of gluconeogenesis [65].

FXR α induces gluconeogenesis Some in vivo studies showed that treatment with the FXR α agonist GW4064 induces *Pepck* mRNA levels in an FXR α -dependent man-

The expression of FXR α was significantly correlated with proliferation in post-menopausal women with lower estrogen concentrations who had ER-positive breast tumors. Additionally, estrogen levels are thought to contribute to the etiology of intrahepatic cholestasis in pregnancy

ner [35, 64]. Renga et al. [66] demonstrated that FXR α activates gluconeogenic pathways in the liver through the direct regulation of GR expression and activity. In *Fxr*-null mice, the decreased accumulation of rate-limiting gluconeogenic enzymes after a period of 15 h of withdrawal is associated with blunted liver expression of GR. Treating wild-type mice with a semisynthetic FXR ligand (6E-CDCA) increases the liver expression of GR, *Pepck*, and *G6pase* mRNA accumulation. *Fxr* α ^{-/-} mice failed to regulate *Pepck* and *G6Pase* in response to dexamethasone, suggesting that FXR α is essential for mediating GR gluconeogenic signaling. GR silencing by siRNA in vitro or its pharmacological antagonism in vivo with mifepristone reverses the effect of FXR α activation on the expression of gluconeogenic genes, suggesting that an FXR α -GR pathway regulates the activation of hepatic gluconeogenesis in the transition from the unfed to the fed state.

A diet issue? Such complex regulation of glucose metabolism in vivo has been recently addressed by Ma et al. [65] who showed that the activation of FXR α exerts opposite effects during unfed or fed conditions. In fed animals, the activation of FXR α downregulates the expression of *Pepck* and *G6Pase*, and the opposite effect was observed in the unfed state.

Fxr α ^{-/-} mice were defective in the induction of gluconeogenic genes, including *Pgc-1 α* and *Pepck*, after 6 h of fasting and displayed lower basal hepatic glucose production, leading to an early hypoglycemia response. This defect in the starvation response was associated with a

significantly reduced hepatic glycogen content in the *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice [67].

At the molecular level, such a model may be partially explained by the relative affinity of FXR α to different types of response element. It is well known that FXR α binds with high affinity to IR-1, while ER-8 sequences have low-affinity binding sites for FXR α [68, 69]. In the fed state, when *Fxr* α mRNA levels are low, the activated receptor regulates the transcription of target genes mainly by binding to IR-1 sequences such as the *Shp* target gene, a known repressor of gluconeogenesis. When *Fxr* α mRNA levels are high, as in the unfed state, the receptor might occupy low-affinity binding sites, such as the ER-8 sequences, which then allow induction of *Gr* transcription by FXR α . This induction of GR leads to increased *Pepck* and *G6pase* mRNA levels.

Integrative conclusions

Together, these data suggest that BA might have an impact on glucocorticoid metabolism at multiple levels. The results obtained in vivo using mice treated with a FXR α agonist correlated with the use of *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice and demonstrate the induction of glucocorticoid levels (Fig. 1).

The increase of GC concentrations following BA exposure is also a result of the increased bioavailability of glucocorticoids and is associated with decreased liver catabolism and reduced inactivation by 11 β HSD2 (Fig. 2).

The activation of FXR α by BA interferes with GC action on glucose metabolism in liver. When these data are combined with the well-established role of GR signaling on glucose metabolism, especially during adaptation between fed/unfed conditions, the data suggest that FXR α modulates the kinetics of glucose homeostasis during fasting. This result highlights a potential positive interaction between the two receptors for metabolic adaptations (Fig. 3).

The links between FXR α and GC on liver glucose metabolism were analyzed by Ma et al. for crosstalk between receptors. Thus, it is important to consider the ligand bioavailability. According to the hypothesis by Ma et al., the impact of BA/FXR α on glucose metabolism depends on the transition between the fed and unfed states, which corresponds to unstressed/stress situations. The impact of BAs on metabolism will be difficult to assess in normal physiology because during fasting, the GC levels are increased, and BA levels are decreased. The relevance of BAs on GR signaling pathways is difficult to integrate. However, it is important to examine these parameters in diseases with high BA levels.

Impact of bile acids on sex hormone pathways

There are limited data available on the interactions between bile acid/FXR α signaling pathways and sex steroid

metabolism. As for GCs, these interactions will be at the levels of synthesis, catabolism, or by modification of the physiological functions of sex steroids.

Sex hormone synthesis

The only link between FXR α and sex hormone synthesis thus far has been obtained from studies on the testes. The testes are composed of seminiferous tubules outlined by a basal membrane that separates them from the interstitial compartment. In the adult, these two compartments ensure the exocrine (spermatozoa production) and the endocrine (hormone synthesis) functions [70]. The testes are involved in the synthesis of estrogens and testosterone. In males, androgens are responsible for the maintenance of fertility and the development of secondary sexual characters [71]. In addition, testosterone is essential for reproductive function, muscle and bone mass maintenance, cognitive function and other physiological parameters. Altered testicular functions may increase the risk of metabolic syndrome [72]. The testes also produce estrogen, which acts through the estrogen receptors ER α and ER β . Estrogen down-regulates the luteinizing hormone receptor (Lhcgr) and inhibits the Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene and others genes implicated in steroidogenesis in Leydig cells [73].

In 2007, Volle et al. [23] detected transcripts of *Fxr* α in the interstitial cells. FXR α was also described as a regulator of the aromatase gene in tumor Leydig cells [24]. A decrease in aromatase expression was observed after induction with GW4064 or CDCA in Leydig cell lines in vitro (Fig. 1). FXR α interferes negatively with SF1 activity on sequences of the PII promoter of aromatase, where FXR α enters in competition with SF-1 for binding a common site. This results in an inhibition of estrogen synthesis.

The in vivo role of FXR α on androgen synthesis was demonstrated using a FXR α synthetic agonist (GW4064). If testosterone concentrations were similar between wild-type and *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice, the administration of GW4064 repressed steroidogenesis after 12 h of treatment and was associated with a decrease in *Star*, *Cyp11a1*, and *3 β -hsd* gene expression (Fig. 1). At the molecular level, it was demonstrated that this repressive effect is consistent with the up-regulation of *Shp*, which then inhibits LRH-1 and SF1 activity, two known inducers of steroidogenesis. It has also been shown that FXR α regulates the synthesis of androsterone [74].

Bile acids and sex hormone catabolism

The potential interaction of FXR α with sex hormone metabolism was also demonstrated through the regulation of the catabolism of these steroids. Such cross-talks occur

via the regulation of several key genes as highlighted in Fig. 2 and detailed below.

CYP3A4 Expressed predominantly in the adult liver and intestine, the cytochrome P450 enzyme CYP3A4 has been shown both in vitro and in vivo to hydroxylate BAs at the 1 β , 6 α , and 6 β positions, thus participating in the elimination of BAs [75, 76]. Several studies have shown that bile acids positively regulate *Cyp3a11* expression, the mouse orthologue of *Cyp3A4*, to initiate their catabolism when they are in excess [75, 77–79]. CYP3A11 plays an important role in the metabolism of both exogenous drugs and endogenous compounds such as cortisol [80], testosterone [81] or estradiol-17 β [82]. This result suggests a potential association with steroid metabolism.

Studies using the HepG2 cell line exposed to either the natural ligand CDCA or to the specific synthetic ligand GW4064 have demonstrated that FXR α controls *Cyp3A4* expression in the liver [79]. This result was also observed in the mouse, as wild-type mice fed GW4064 have increased hepatic levels of *Cyp3a11*, which is the rodent homologue of human CYP3A4 [79]. However, this effect was not observed in *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice.

Epidemiological and clinical evidence links a *CYP3A4* promoter variant (*CYP3A4*1B* (rs2740574)) with the incidence of prostate cancer and the clinical grade of the tumor and disease progression [83–85]. There is no significant association between the *CYP3A41B** genotype and the levels of serum testosterone. This result suggests that CYP3A4 might have a minimal impact on hepatic catabolism [86]. The decreased *CYP3A4* expression within prostate tissue is associated with a higher Gleason score and poorer cancer-specific survival [87, 88]. This result suggests that CYP3A4 may play a critical role in maintaining androgen homeostasis within the prostate and loss of CYP3A4 leads to the development of cancer.

SULT2A1 In addition to hydroxylation, sulphate or glucuronide conjugation are important mechanisms for the detoxification of steroids. Upon conjugation, the substrates become more polar, less toxic and more water soluble, facilitating their clearance.

Dehydroepiandrosterone-sulphotransferase (SULT2A1/Sult2a1) are phase II metabolizing enzymes that catalyze the sulphating of various exogenous chemicals and endogenous compounds including testosterone, estrogen, and BAs [89–91].

Increased serum and urine levels of sulphated BAs were described in patients with cholestatic liver diseases [92, 93]. These clinical observations suggest a potential involvement of BAs in controlling their own sulphating through the regulation of enzymes such as *Sult2a1*. This is consistent with the fact that *Sult2A1* is expressed abundantly in the liver

and intestine, the two first-pass metabolic tissues where FXR α is also expressed. Song et al. have demonstrated that primary bile acid CDCA treatment was shown to induce rat/mouse *Sult2a1* promoter activity in transfected Caco-2 and HepG2 cells in vitro. This rat/mouse *Sult2a1* induction involved an activated FXR α /RXR heterodimer binding to an atypical FXR α response element (IRO) located in the 5' flanking region [90].

However, sequence alignments have shown that this IRO element does not exist in the human SULT2A1 5'-flanking region, demonstrating that the regulation by FXR α might not be conserved between species [94, 95]. Human *SULT2A1* mRNA levels failed to be modulated in cultured human primary hepatocytes treated with CDCA [95]. Further studies are needed to understand how FXR regulates human *SULT2A1* expression.

Consistently, in vivo investigations showed that FXR α may be involved in the repression of basal *Sult2a1* expression. Moreover, CDCA-fed mice present markedly decreased *Sult2a1* expression in wild-type mice. This is correlated with an increased level of *Shp*, suggesting a FXR α -dependant mechanism, which was confirmed by the lack of *Sult2a1* modulation in *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice following a diet [96].

Interestingly, *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice present an increased level of *Sult2a1* in basal physiology and are resistant to LCA induced liver toxicity compared to wild-type (WT) mice [97].

SULT2A1 was originally involved in the inactivation of androgen hormones. In the rodent liver, the high expression of *Sult2a1* during the androgen-insensitive state of the hepatic tissue in senescent males is thought to be a result of the efficient inactivation of androgens into androgen sulphates [98, 99]. Thomae et al. [100] reported 3 *SULT2A1* gene alterations that result in decreased *Sult2a1* expression and activity. Interestingly, these alterations were present only in African American patients and were suggested to be partially responsible for the androgen-associated risk of disease. A significant increase in the DHEA-to-DHEA-sulphate ratio was observed in African American participants with a heterozygous *SULT2A1* A63P/A261T genotype. However, the presence of the different *SULT2A1* alleles was not associated with prostate cancer.

Moreover, as FXR α and AR are both able to control *Sult2a1* gene expression, it is reasonable to think that bile acid and androgen metabolisms could crosstalk through *Sult2a1* regulation [101, 102].

UGTs Sex steroid catabolism also involves UDP-glucuronosyltransferases (UGT). Among the 18 functional UGT enzymes identified in humans, UGT2B7, UGT2B15, and UGT2B17 have a remarkable capacity to conjugate androgens [103].

UGT2b7 A tumor-suppressor function was suggested for *UGT2B7* by preventing the accumulation of mutagenesis compounds like 4-hydroxyestrone [104]. Indeed, reduced levels of the UGT2B7 protein and glucuronidation of 4-hydroxyestrone were shown in invasive cancers. However, the role of the bile acid challenge in vivo on UGT2B7 expression still remains to be determined.

UGT2B4 (liver) Barbier et al. [8] identified human UGT2B4 as a target gene of FXR α . Activation of FXR α by CDCA or GW4064 in primary human hepatocytes or in the HepG2 cell line resulted in increased *UGT2B4* expression through an atypical binding of FXR α as a monomer to a single hexameric DNA motif.

Interestingly, the PPAR α agonist fenofibrate was shown to activate the *UGT2B4* gene promoter through a specific peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) response element [105]. DCA also induces the transcription of PPAR α gene via an FXR α -mediated mechanism. Thus, bile acids may induce *UGT2B4* expression directly through activation of FXR α and/or indirectly through FXR α -dependent induction of PPAR α , which then activates *UGT2B4* transcription. Through these mechanisms, BAs may be part of a negative feedback mechanism by which BAs control their elimination to prevent pathophysiological toxicity.

The potential impact of BAs on steroid metabolism should be taken into consideration as UGT2B4 is known to be active on 5 α -reduced androgens and polyhydroxylated estrogens, including estriol, 4-hydroxyestrone and 2-hydroxyestriol.

UGT1A3 (liver) Hepg2 cells treated with LCA, CDCA, and GW4064 present increased *UGT1A3* mRNA levels. The resulting CDCA-24-glucuronide was shown to exhibit an antagonistic effect on FXR α as feedback inhibition. *UGT1A3* is expressed in the liver, intestine, and large bowel [106–108]. Apart from BA, UGT1A3 metabolizes xenobiotics such as polyaromatic hydrocarbons as well as estrogens, and vitamin D derivatives [109–111]. Because *UGT1A3* is significantly induced by FXR α in response to bile acids, this regulation could link bile acid metabolism and steroid hormone metabolism alteration.

UGT2B15/17 (prostate) While glucuronidation was generally considered to be a hepatic/intestinal detoxification mechanism, extrahepatic glucuronidation is now established as an efficient way to locally inactivate endogenous bioactive molecules [103, 112]. This is particularly true for androgens, which are efficiently glucuronidated within their target tissues, such as the human prostate [113].

A regulatory function of the nuclear receptor FXR α in androgen metabolism has been shown in prostate

cancer LNCaP cells [114]. CDCA or GW4064 repress gene expression and androgen-conjugating activity of the UGT2B15 and UGT2B17 enzymes in prostate cancer LNCaP cells. The regulation of UGT2B15 expression by FXR α seemed to be tissue-specific, as previous data have shown that CDCA does not modulate *UGT2B15* mRNA in human hepatocytes [8]. Moreover, *Fxr* $\alpha^{-/-}$ mice present an increased level of *UGT* mRNA accumulation in the prostate compared to wild-type mice. The exact mechanism by which FXR α negatively regulates *UGT2B15* and *UGT2B17* genes, and the physiological implications of this regulation, remain to be determined because androgen glucuronidation is almost absent in the rodent prostate [114–116].

In contrast, the importance of glucuronidation for androgen metabolism in the human prostate was highlighted by the observation that polymorphisms within androgen-glucuronidating genes are associated with an increased risk for prostate cancer [117, 118]. A *UGT2B17* inactivation polymorphism was associated with an increased prostate cancer risk [119]. The D85 polymorphism of UGT2B15, which leads to a less efficient protein for conjugation of 3-diol and DHT, results in higher androgen exposure in prostate tissue. In accordance with these findings, the D85 allele has been reported to increase prostate cancer risk and aggressiveness [120, 121].

During cholestasis, plasma levels of bile acids are drastically increased [122], and it can be hypothesized that in such patients, glucuronidation of androgens may be reduced, resulting in the accumulation of androgens in the prostate, which may correspond to a pro-carcinogenic mechanism. Interestingly, the development of cholestasis has been reported in various patients with prostate cancer [123–125].

This conclusion is particularly important because FXR α agonists are currently considered as a promising treatment of several diseases such as hepatitis C or metabolic syndrome, as highlighted by several ongoing clinical trials (www.clinicaltrials.org).

FXR α interferes with sex hormone signaling pathways

Potential impact of FXR α on AR pathways (Fig. 3) The role of FXR α on androgen signaling pathways has not been clearly demonstrated and is still speculative. However, it can be hypothesized that by controlling *Shp* expression, FXR α could interfere with the actions of androgen. SHP is able to interact with numerous nuclear receptors. It has been demonstrated in vitro using GST-pull-down experiments that SHP interacts and inhibits the androgen receptor activity [126]. SHP acts by competing with AR co-activators. These data opened a new field of research concerning how BAs might interfere with androgen signaling pathways. This is

even more interesting in line with the described inhibitory effect of FXR α synthetic ligand on testosterone production.

Potential impact of FXR α on ER Any impact on breast cancer? (Fig. 3). Although no data describe links between FXR α and female hormone synthesis, reports suggest a potential role for FXR α in breast pathophysiology. Estrogen exposure has long been known to contribute to the etiology of breast cancers [127], and approximately two-thirds of these cases are characterized by dysregulation of the estrogen receptor α (ER α) signaling [128]. Therapy consists of blocking estrogen synthesis (aromatase inhibitors) or ER transactivation (estrogen receptor modulators, such as tamoxifen) [129, 130]. Evidence suggests a potential role for bile acids in breast cancer etiology (Fig. 3). The accumulation of bile acids has been reported in breast cyst fluid and has been proposed as a potential risk factor for breast cancer [131–133]. Women with breast cancer may have differences in the fecal excretion of BAs compared to controls [134–136]. In addition, long-term follow-up of women undergoing cholecystectomy has revealed a higher risk of breast cancer [137].

The potential involvement of FXR α was highlighted in several clinical studies. Interestingly, FXR α was shown to be expressed in normal breast tissue, and several studies established significant correlations between FXR α and ER expression in breast cancer samples [138, 139]. Fifty percent of ER-negative breast cancer samples had weak FXR α expression, and 70 % of ER-positive samples had FXR α expression suggestive of crosstalk between ER and FXR α signaling [139]. These clinical data are supported by semi-quantitative analyses revealing that the ER-positive breast cancer cell line MCF-7 has higher FXR α protein accumulation than the ER-negative MDA-MD 231 cell line [37]. A significant correlation between FXR α and the Ki67 proliferative marker has also been observed. FXR α expression was significantly correlated with proliferation in patients with ER-positive breast tumors in postmenopausal women, with lower estrogen concentrations [37]. In the context of low estrogen, FXR α expression may play a key role in proliferation. This hypothesis is further supported by the presence of high plasma levels of DCA in postmenopausal breast cancer patients [140], suggesting that bile acids might be involved in the onset and development of mammary gland cancers in an estrogen-independent context through the activation of FXR α .

If these correlations are established in patients, the molecular mechanisms remain unclear with contradictory results.

In vitro data show that activated FXR α induces a mitogenic response in a breast cancer cell line through positive crosstalk with the ER. Indeed, the ER-positive cell line MCF-7 shows increased proliferation in response to

FXR α activation. This was associated with a pro-estrogenic response, as measured by the downregulation of ER α accumulation [37, 139]. These results suggest that in absence of estrogens, these pro-estrogenic patterns should be a result of FXR α -mediated activation of ER α dependent transcription. At a relatively low concentration, CDCA glucuronide increased MCF-7 growth combined with this same pro-estrogenic effect (decreased ER α accumulation and up-regulated ER target genes). However, while low doses of CDCA lead to this same estrogenic response, a contradictory decrease in proliferation was observed. These discrepancies might be explained by dose effects of bile acids on proliferative pathways through ER activation [141].

In contrast to previous reports [37, 139], Giordano et al. show that CDCA or GW4064 inhibited proliferation in the breast cancer cell line MCF-7 and in the Tam-resistant breast cancer cell line MCF-7/TR1. This anti-proliferative effect of FXR α suggests repression of the HER2 receptor, perhaps by enhancing formation of a FXR α and NF- κ B complex inhibiting the binding of NF- κ B to its responsive element located in the human HER2 promoter region.

High concentrations of FXR α ligands exert an anti-proliferative effect on breast carcinoma cell lines, regardless of their ER status. In breast cancer cell lines, FXR α agonists down-regulated the breast cancer target gene aromatase. These data could also be relevant, as aromatase inhibition is classically used in breast cancer treatment.

Integrative conclusion

Taken together, these data demonstrate complex interactions between BAs and sex hormone homeostasis. Several findings suggest that BAs decrease sex hormone synthesis (testosterone and estrogen) in male mice (Fig. 1), but this result has not been demonstrated in female mice and or in humans. The impact of the BAs/FXR α pathways in lowering the levels of sex hormones is also dependent on their effects on liver catabolism through the regulation of genes such as *Sult2a1* and *Cyp3a* (Fig. 2). These data are consistent with the known decrease in plasma testosterone levels in a male experimental model of liver injuries [142].

A decrease in sex hormone levels in males may have major effects on sexual maturation and/or the maintenance of secondary sexual characters.

Hormone concentrations are finely controlled in target organs such as the prostate. In cell lines, there is evidence for a link between FXR-mediated maintenance of BA homeostasis and hormone steroid inactivation. It has been hypothesized that FXR α transactivation in liver or prostate tissues may prevent androgen accumulation and the development of androgen-dependent cancers such prostate

cancer through the regulation of Ugt2b15/17. However, there are no data describing FXR α dependent regulation of Cyp3A4 within the prostate.

The interaction of FXR α with the estrogen receptor in breast cancer (Fig. 3) supports crosstalk between FXR α and ER in inducing tumor progression. However, no clear in vitro evidence has been provided. This issue highlights the need for a better understanding of these pathways to determine if FXR α agonists/antagonists could be useful drugs in some cases of breast cancers.

Conclusions and perspectives

BAs represent the main cholesterol catabolites. Because they share the same origin as steroids, there may be some crosstalk between BA metabolism and steroids. Recent studies have focused on bile acids and their nuclear receptor, FXR α (NR1H4).

Glucocorticoids and estrogen can inhibit BA-FXR α signaling pathways in the liver and mammary glands. Alternatively, as reported in this review, FXR α /BA pathways can affect steroid metabolism at the levels of synthesis, catabolism and downstream signaling pathways. This is highlighted by the fact that FXR α is expressed in steroidogenic tissues, such as the adrenal glands and the testis, where FXR α controls steroid production. FXR α also interferes with steroid signaling pathways in target tissues such as the liver through crosstalk with the glucocorticoid receptor (GR). The evidence for crosstalk between the FXR α /BA pathways and steroids has been reinforced by the recent identification of the impact of glucocorticoids and estrogen on the activity of FXR α .

Several FXR α polymorphisms have been detected in humans, and they are associated with pathologies including obesity and gallstone diseases, such as cholelithiasis or intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) [143, 144], [145, 146]. The role of FXR α in the metabolism of either glucocorticoids or sex hormones could be used to determine if altered FXR α signaling pathways are involved in idiopathic diseases. Screening patients for FXR α polymorphisms could offer new insight into the origins of these pathologies and determine if FXR α is a diagnostic/prognostic marker.

The crosstalk between BAs and steroid metabolism has important roles in health. Further studies are needed to clearly identify all of the pathways activated by BAs through FXR α . The complexity of the system is important to understand because the activation of this receptor could lead to both beneficial [147] and deleterious effects. This phenomenon is of particular interest when these endogenous molecules abnormally accumulate in pathophysiological conditions, such as liver injury.

The incidence of liver disease is difficult to establish because the concept encompasses many different types of pathologies. The onset of many types of liver disease is insidious and is not detected until hepatic decompensation occurs. The real significance of steroid metabolism in the physiology of liver diseases must be underestimated.

Clinical data have suggested a link between liver dysfunction and male fertility disorders [148, 149]. Experimental models of cholestasis induced by bile duct ligation to increase plasma bile acid levels [150] have been associated with testicular alterations [151, 142]. In this pathological context, reduced plasma testosterone levels have been associated with loss of the germ line in the seminiferous tubules. This effect can result in reduced fertility or infertility and altered male sexual maturation.

The role BA in steroid metabolism should be considered with the fact that FXR α is targeted for pharmacological drugs in the treatment of such diseases as diabetes [152]. It will not be simple to target one BA receptor to manage a specific pathology. Therefore, we will have to consider that interfering with steroid metabolism might lead to deleterious side effects from this therapy.

In addition to their involvement in the control of gluconeogenesis in the liver [41], GCs also regulate or support a variety of important cardiovascular, metabolic, immunological, and homeostatic functions. Therefore, before using FXR α agonists as a long-term treatment for diseases, it will be necessary to ensure there are no deleterious effects on cardiac function, hypertension or immunity.

Studies will be required to determine whether long-term treatment with FXR α modulators affects testosterone synthesis in men and to verify the interactions with AR signaling pathways. The inhibition of androgens could affect secondary sexual characteristics. Additionally, there could be a long-term impact on pathologies, including the development of prostate cancer.

Pregnancy cholestasis leads to an increased risk of pre-term delivery and perinatal mortality [153]. This condition is associated with increased bile acid levels and are treated with either cholestyramine or ursodeoxycholic acid. Previous reports have described a role for FXR α during pregnancy, and it is associated with increased hepatic bile acid concentrations in mice and reduced FXR α function [154]. Thus, we must analyze mouse models to determine the impact of FXR α agonists on fetal health before treating patients with preclinical diabetes.

Perspectives

As FXR α agonists are explored as potential therapeutic drugs for the treatment of several diseases, the development of strategy to avoid systemic effects will be needed. It will be necessary to target this receptor in a cell-specific

manner. It will be important to take into consideration the patient history (hormonal status) for developing personalized therapy. This highlights the fact that drug development must rely on a strong fundamental research in integrative physiology and that drugs cannot be developed based on molecular mechanisms characterized in vitro or in vivo in a single organ. This is a challenging, open field for future research that will require interdisciplinary approaches.

Acknowledgments The lab is supported by the Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche (to MB), Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme to DHV), Nouveau Chercheur Auvergne (to SB and #R12087CC to DHV), ANR Jeune Chercheur (#1103, to DHV).

References

- Poupon R, Chignard N, Rosmorduc O, Barbu V, Housset C (2004) Biliary function and its regulation. *Med Sci (Paris)* 20:1096–1099
- Russell DW (2003) The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem* 72:137–174
- Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 47:241–259
- Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633–671
- Mangelsdorf DJ, Evans RM (1995) The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83:841–850
- Seol W, Choi HS, Moore DD (1995) Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 9:72–85
- Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* 275:10638–10647
- Barbier O, Torra IP, Sirvent A, Claudel T, Blanquart C, Duran-Sandoval D, Kuipers F, Kosykh V, Fruchart J-C, Staels B (2003) FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124:1926–1940
- Claudel T, Sturm E, Duez H, Torra IP, Sirvent A, Kosykh V, Fruchart J-C, Dallongeville J, Hum DW, Kuipers F, Staels B (2002) Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J Clin Invest* 109:961–971
- Fiorucci S, Rizzo G, Donini A, Distrutti E, Santucci L (2007) Targeting farnesoid X receptor for liver and metabolic disorders. *Trends Mol Med* 13:298–309
- Claudel T, Staels B, Kuipers F (2005) The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2020–2030
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284:1362–1365
- Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM (1999) Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284:1365–1368
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM (1999) Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell* 3:543–553
- Pellicciari R, Costantino G, Camaioni E, Sadeghpour BM, Entrena A, Willson TM, Fiorucci S, Clerici C, Gioiello A (2004) Bile acid derivatives as ligands of the farnesoid X receptor. Synthesis, evaluation, and structure–activity relationship of a series of body and side chain modified analogues of chenodeoxycholic acid. *J Med Chem* 47:4559–4569
- Fujino T, Une M, Imanaka T, Inoue K, Nishimaki-Mogami T (2004) Structure-activity relationship of bile acids and bile acid analogs in regard to FXR activation. *J Lipid Res* 45:132–138
- Huber RM, Murphy K, Miao B, Link JR, Cunningham MR, Rupar MJ, Gunyuzlu PL, Haws TF, Kassam A, Powell F, Hollis GF, Young PR, Mukherjee R, Burn TC (2002) Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290:35–43
- Modica S, Gadaleta RM, Moschetta A (2010) Deciphering the nuclear bile acid receptor FXR paradigm. *Nucl Recept Signal* 8:e005
- Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278:104–110
- Lee FY, Lee H, Hubbert ML, Edwards PA, Zhang Y (2006) FXR, a multipurpose nuclear receptor. *Trends Biochem Sci* 31:572–580
- Zhang Y, Kast-Woelbern HR, Edwards PA (2003) Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J Biol Chem* 278:104–110
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B (2009) Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89:147–191
- Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, Houten SM, Cummins CL, Lobaccaro J-MA, Verhoeven G, Schoonjans K, Auwerx J (2007) The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 21:303–315
- Catalano S, Malivindi R, Giordano C, Gu G, Panza S, Bonfiglio D, Lanzino M, Sisci D, Panno ML, Andò S (2010) Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J Biol Chem* 285:5581–5593
- Bishop-Bailey D, Walsh DT, Warner TD (2004) Expression and activation of the farnesoid X receptor in the vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:3668–3673
- Schote AB, Turner JD, Schiltz J, Muller CP (2007) Nuclear receptors in human immune cells: expression and correlations. *Mol Immunol* 44:1436–1445
- Guo GL, Santamarina-Fojo S, Akiyama TE, Amar MJA, Paigen BJ, Brewer B Jr, Gonzalez FJ (2006) Effects of FXR in foam-cell formation and atherosclerosis development. *Biochim Biophys Acta* 1761:1401–1409
- Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro J-MA, Volle DH (2013) Bile acids: from digestion to cancers. *Biochimie* 95:504–517
- Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G, Gonzalez FJ (2000) Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102:731–744
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6:517–526
- Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback

- regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6:507–515
32. Trauner M, Boyer JL (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83:633–671
 33. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG, Luo G, Jones SA, Goodwin B, Richardson JA, Gerard RD, Repa JJ, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA (2005) Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab* 2:217–225
 34. Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Moore DD, Auwerx J (2004) Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 113:1408–1418
 35. Stayrook KR, Bramlett KS, Savkur RS, Ficorilli J, Cook T, Christe ME, Michael LF, Burris TP (2005) Regulation of carbohydrate metabolism by the farnesoid X receptor. *Endocrinology* 146:984–991
 36. Lu Y, Zhang Z, Xiong X, Wang X, Li J, Shi G, Yang J, Zhang X, Zhang H, Hong J, Xia X, Ning G, Li X (2012) Glucocorticoids promote hepatic cholestasis in mice by inhibiting the transcriptional activity of the farnesoid X receptor. *Gastroenterology* 143:1630–1640.e8
 37. Journe F, Durbecq V, Chaboteaux C, Rouas G, Laurent G, Nonclercq D, Sotiriou C, Body J-J, Larsimont D (2009) Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Res Treat* 115:523–535
 38. Milona A, Owen BM, Cobbold JFL, Willemsen ECL, Cox IJ, Boudjelal M, Cairns W, Schoonjans K, Taylor-Robinson SD, Klomp LWJ, Parker MG, White R, Van Mil SWC, Williamson C (2010) Raised hepatic bile acid concentrations during pregnancy in mice are associated with reduced farnesoid X receptor function. *Hepatology* 52:1341–1349
 39. Azer SA, Canfield PJ, Stacey NH (1995) Hepatoprotection in ethinylestradiol-treated rats is provided by tauroursodeoxycholic acid, but not by ursodeoxycholic acid. *J Gastroenterol Hepatol* 10:261–269
 40. Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, Guo GL, Gonzalez FJ, Korach KS, Maronpot RR, Negishi M (2006) Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethinylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem* 281:16625–16631
 41. Kharwanlang B, Sharma R (2011) Molecular interaction between the glucocorticoid receptor and MAPK signaling pathway: a novel link in modulating the anti-inflammatory role of glucocorticoids. *Indian J Biochem Biophys* 48:236–242
 42. Higashiyama H, Kinoshita M, Asano S (2008) Immunolocalization of farnesoid X receptor (FXR) in mouse tissues using tissue microarray. *Acta Histochem* 110:86–93
 43. Xing Y, Saner-Amigh K, Nakamura Y, Hinshelwood MM, Carr BR, Mason JJ, Rainey WE (2009) The farnesoid X receptor regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol* 299:153–162
 44. Hoekstra M, Van der Sluis RJ, Li Z, Oosterveer MH, Groen AK, Van Berkel TJC (2012) FXR agonist GW4064 increases plasma glucocorticoid levels in C57BL/6 mice. *Mol Cell Endocrinol* 362:69–75
 45. Chao F, Gong W, Zheng Y, Li Y, Huang G, Gao M, Li J, Kuruba R, Gao X, Li S, He F (2010) Upregulation of scavenger receptor class B type I expression by activation of FXR in hepatocyte. *Atherosclerosis* 213:443–448
 46. Hoekstra M, Van der Sluis RJ, Li Z, Oosterveer MH, Groen AK, Van Berkel TJC (2012) FXR agonist GW4064 increases plasma glucocorticoid levels in C57BL/6 mice. *Mol Cell Endocrinol* 362:69–75
 47. Xing Y, Saner-Amigh K, Nakamura Y, Hinshelwood MM, Carr BR, Mason JJ, Rainey WE (2009) The farnesoid X receptor regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human adrenal cells. *Mol Cell Endocrinol* 299:153–162
 48. Stauffer AT, Rochat MK, Dick B, Frey FJ, Odermatt A (2002) Chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and cause cortisol-induced transcriptional activation of the mineralocorticoid receptor. *J Biol Chem* 277:26286–26292
 49. Morris DJ, Souness GW, Latif SA, Hardy MP, Brem AS (2004) Effect of chenodeoxycholic acid on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in various target tissues. *Metab, Clin Exp* 53:811–816
 50. Morris DJ, Souness GW, Latif SA, Hardy MP, Brem AS (2004) Effect of chenodeoxycholic acid on 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in various target tissues. *Metab, Clin Exp* 53:811–816
 51. Vierhapper H, Nowotny P, Waldhäusl W (2000) Production rates of testosterone in patients with Cushing's syndrome. *Metab, Clin Exp* 49:229–231
 52. Breen KM, Karsch FJ (2006) New insights regarding glucocorticoids, stress and gonadotropin suppression. *Front Neuroendocrinol* 27:233–245
 53. Badrinarayanan R, Rengarajan S, Nithya P, Balasubramanian K (2006) Corticosterone impairs the mRNA expression and activity of 3beta- and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in adult rat Leydig cells. *Biochem Cell Biol* 84:745–754
 54. King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR (2000) UDP-glucuronosyltransferases. *Curr Drug Metab* 1:143–161
 55. Lu Y, Heydel J-M, Li X, Bratton S, Lindblom T, Radominska-Pandya A (2005) Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab Dispos* 33:937–946
 56. Girard C, Barbier O, Veilleux G, El-Alfy M, Bélanger A (2003) Human uridine diphosphate-glucuronosyltransferase UGT2B7 conjugates mineralocorticoid and glucocorticoid metabolites. *Endocrinology* 144:2659–2668
 57. Cassuto H, Kochan K, Chakravarty K, Cohen H, Blum B, Olszwang Y, Hakimi P, Xu C, Massillon D, Hanson RW, Reshef L (2005) Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem* 280:33873–33884
 58. McMahon M, Gerich J, Rizza R (1988) Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab Rev* 4:17–30
 59. Opherck C, Tronche F, Kellendonk C, Köhl Müller D, Schulze A, Schmid W, Schütz G (2004) Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol* 18:1346–1353
 60. Fiorucci S, Cipriani S, Baldelli F, Mencarelli A (2010) Bile acid-activated receptors in the treatment of dyslipidemia and related disorders. *Prog Lipid Res* 49:171–185
 61. Mencarelli A, Cipriani S, Renga B, Francisci D, Palladino G, Distrutti E, Baldelli F, Fiorucci S (2010) The bile acid sensor FXR protects against dyslipidemia and aortic plaques development induced by the HIV protease inhibitor ritonavir in mice. *PLoS ONE* 5:e13238
 62. De Fabiani E, Mitro N, Gilardi F, Caruso D, Galli G, Crestani M (2003) Coordinated control of cholesterol catabolism to bile acids and of gluconeogenesis via a novel mechanism of transcription regulation linked to the fasted-to-fed cycle. *J Biol Chem* 278:39124–39132
 63. Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, Matsuzaki H, Hirota K, Ishida J, Fukamizu A (2004) Bile acids regulate gluconeogenic

- gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 279:23158–23165
64. Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, Willson TM, Edwards PA (2006) Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1006–1011
 65. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD (2006) Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest* 116:1102–1109
 66. Renga B, Mencarelli A, D'Amore C, Cipriani S, Baldelli F, Zampella A, Distrutti E, Fiorucci S (2012) Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J* 26:3021–3031
 67. Cariou B, Van Harmelen K, Duran-Sandoval D, Van Dijk T, Grefhorst A, Bouchaert E, Fruchart J-C, Gonzalez FJ, Kuipers F, Staels B (2005) Transient impairment of the adaptive response to fasting in FXR-deficient mice. *FEBS Lett* 579:4076–4080
 68. Downes M, Verdecia MA, Roecker AJ, Hughes R, Hogenesch JB, Kast-Woelbern HR, Bowman ME, Ferrer J-L, Anisfeld AM, Edwards PA, Rosenfeld JM, Alvarez JGA, Noel JP, Nicolaou K, Evans RM (2003) A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol Cell* 11:1079–1092
 69. Laffitte BA, Kast HR, Nguyen CM, Zavacki AM, Moore DD, Edwards PA (2000) Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J Biol Chem* 275:10638–10647
 70. Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro J-MA, Volle DH (2013) Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol* 368:30–46
 71. Haider SG (2004) Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181–241
 72. Kupelian V, Page ST, Araujo AB, Travison TG, Bremner WJ, McKinlay JB (2006) Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. *J Clin Endocrinol Metab* 91:843–850
 73. Abney TO (1999) The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 64:610–617
 74. Gray MA, Squires EJ (2012) Effects of nuclear receptor transactivation on steroid hormone synthesis and gene expression in porcine Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 133C:93–100
 75. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Willson TM, Koller BH, Kliewer SA (2001) The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3369–3374
 76. Bodin K, Lindbom U, Diczfalussy U (2005) Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim Biophys Acta* 1687:84–93
 77. Xie W, Radominska-Pandya A, Shi Y, Simon CM, Nelson MC, Ong ES, Waxman DJ, Evans RM (2001) An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3375–3380
 78. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ (2002) Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 296:1313–1316
 79. Gnerre C, Blättler S, Kaufmann MR, Looser R, Meyer UA (2004) Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* 14:635–645
 80. Abel SM, Back DJ (1993) Cortisol metabolism in vitro—III. Inhibition of microsomal 6 beta-hydroxylase and cytosolic 4-ene-reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46:827–832
 81. Waxman DJ (1988) Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochem Pharmacol* 37:71–84
 82. Kerlan V, Dreano Y, Bercovici JP, Beaune PH, Floch HH, Berthou F (1992) Nature of cytochromes P450 involved in the 2-/4-hydroxylations of estradiol in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 44:1745–1756
 83. Rebbeck TR, Jaffe JM, Walker AH, Wein AJ, Malkowicz SB (1998) Modification of clinical presentation of prostate tumors by a novel genetic variant in CYP3A4. *J Natl Cancer Inst* 90:1225–1229
 84. Paris PL, Kupelian PA, Hall JM, Williams TL, Levin H, Klein EA, Casey G, Witte JS (1999) Association between a CYP3A4 genetic variant and clinical presentation in African-American prostate cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:901–905
 85. Tayeb MT, Clark C, Haites NE, Sharp L, Murray GI, McLeod HL (2003) CYP3A4 and VDR gene polymorphisms and the risk of prostate cancer in men with benign prostate hyperplasia. *Br J Cancer* 88:928–932
 86. Siemes C, Visser LE, De Jong FH, Coebergh J-WW, Uitterlinden AG, Hofman A, Stricker BHC, Van Schaik RHN (2010) Cytochrome P450 3A gene variation, steroid hormone serum levels and prostate cancer—the Rotterdam Study. *Steroids* 75:1024–1032
 87. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Murata T, Takayama K, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Homma Y, Inoue S (2009) Expression of cytochrome P450 3A4 and its clinical significance in human prostate cancer. *Urology* 74:391–397
 88. Finnstrom N, Bjelfman C, Soderstrom TG, Smith G, Egevad L, Norlen BJ, Wolf CR, Rane A (2001) Detection of cytochrome P450 mRNA transcripts in prostate samples by RT-PCR. *Eur J Clin Invest* 31:880–886
 89. Falany CN (1997) Enzymology of human cytosolic sulfotransferases. *FASEB J* 11:206–216
 90. Song CS, Echchgadda I, Baek BS, Ahn SC, Oh T, Roy AK, Chatterjee B (2001) Dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene induction by bile acid activated farnesoid X receptor. *J Biol Chem* 276:42549–42556
 91. Strott CA (2002) Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev* 23:703–732
 92. Bremmelgaard A, Sjövall J (1979) Bile acid profiles in urine of patients with liver diseases. *Eur J Clin Invest* 9:341–348
 93. Thomassen PA (1979) Urinary bile acids in late pregnancy and in recurrent cholestasis of pregnancy. *Eur J Clin Invest* 9:425–432
 94. Chen X, Zhang J, Baker SM, Chen G (2007) Human constitutive androstane receptor-mediated methotrexate induction of human dehydroepiandrosterone sulfotransferase (hSULT2A1). *Toxicology* 231:224–233
 95. Fang H-L, Strom SC, Cai H, Falany CN, Kocarek TA, Runge-Morris M (2005) Regulation of human hepatic hydroxysteroid sulfotransferase gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcription factor. *Mol Pharmacol* 67:1257–1267
 96. Miyata M, Matsuda Y, Tsuchiya H, Kitada H, Akase T, Shimada M, Nagata K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y (2006) Chenodeoxycholic acid-mediated activation of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase. *Drug Metab Pharmacokinet* 21:315–323
 97. Kitada H, Miyata M, Nakamura T, Tozawa A, Honma W, Shimada M, Nagata K, Sinal CJ, Guo GL, Gonzalez FJ, Yamazoe Y (2003) Protective role of hydroxysteroid sulfotransferase in lithocholic acid-induced liver toxicity. *J Biol Chem* 278:17838–17844

98. Chatterjee B, Song CS, Kim JM, Roy AK (1994) Androgen and estrogen sulfotransferases of the rat liver: physiological function, molecular cloning, and in vitro expression. *Chem Biol Interact* 92:273–279
99. Chan J, Song CS, Matusik RJ, Chatterjee B, Roy AK (1998) Inhibition of androgen action by dehydroepiandrosterone sulfotransferase transfected in PC-3 prostate cancer cells. *Chem Biol Interact* 109:267–278
100. Thomaes BA, Eckloff BW, Freimuth RR, Wieben ED, Weinshilboum RM (2002) Human sulfotransferase SULT2A1 pharmacogenetics: genotype-to-phenotype studies. *Pharmacogenomics J* 2:48–56
101. Song CS, Jung MH, Kim SC, Hassan T, Roy AK, Chatterjee B (1998) Tissue-specific and androgen-repressible regulation of the rat dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene promoter. *J Biol Chem* 273:21856–21866
102. Chatterjee B, Song CS, Jung MH, Chen S, Walter CA, Herbert DC, Weaker FJ, Mancini MA, Roy AK (1996) Targeted overexpression of androgen receptor with a liver-specific promoter in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:728–733
103. Guillemette C, Bélanger A, Lépine J (2004) Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview. *Breast Cancer Res* 6:246–254
104. Gestl SA, Green MD, Shearer DA, Frauenhoffer E, Tephly TR, Weisz J (2002) Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxystosterone and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers. *Am J Pathol* 160:1467–1479
105. Barbier O, Duran-Sandoval D, Pineda-Torra I, Kosykh V, Fruchart J-C, Staels B (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor alpha induces hepatic expression of the human bile acid glucuronidating UDP-glucuronosyltransferase 2B4 enzyme. *J Biol Chem* 278:32852–32860
106. Strassburg CP, Manns MP, Tukey RH (1998) Expression of the UDP-glucuronosyltransferase 1A locus in human colon. Identification and characterization of the novel extrahepatic UGT1A8. *J Biol Chem* 273:8719–8726
107. Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP (2000) Polymorphic gene regulation and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 275:36164–36171
108. Strassburg CP, Oldhafer K, Manns MP, Tukey RH (1997) Differential expression of the UGT1A locus in human liver, biliary, and gastric tissue: identification of UGT1A7 and UGT1A10 transcripts in extrahepatic tissue. *Mol Pharmacol* 52:212–220
109. Doty P, Kasper J, Litvak S (1996) Consumer-directed models of personal care: lessons from Medicaid. *Milbank Q* 74:377–409
110. Iwai M, Maruo Y, Ito M, Yamamoto K, Sato H, Takeuchi Y (2004) Six novel UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A3) polymorphisms with varying activity. *J Hum Genet* 49:123–128
111. Kasai N, Sakaki T, Shinkyo R, Ikushiro S-I, Iyanagi T, Ohta M, Inouye K (2005) Metabolism of 26,26,26,27,27,27-F6-1 alpha,23S,25-trihydroxyvitamin D3 by human UDP-glucuronosyltransferase 1A3. *Drug Metab Dispos* 33:102–107
112. Bélanger A, Pelletier G, Labrie F, Barbier O, Chouinard S (2003) Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferase enzymes in humans. *Trends Endocrinol Metab* 14:473–479
113. Barbier O, Lapointe H, El Alfy M, Hum DW, Bélanger A (2000) Cellular localization of uridine diphosphoglucuronosyltransferase 2B enzymes in the human prostate by in situ hybridization and immunohistochemistry. *J Clin Endocrinol Metab* 85:4819–4826
114. Kaeding J, Bouchaert E, Bélanger J, Caron P, Chouinard S, Verreault M, Larouche O, Pelletier G, Staels B, Bélanger A, Barbier O (2008) Activators of the farnesoid X receptor negatively regulate androgen glucuronidation in human prostate cancer LNCAP cells. *Biochem J* 410:245–253
115. Barbier O, Bélanger A (2003) The cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) is the best animal model for the study of steroid glucuronidation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:235–245
116. Guillemette C, Hum DW, Bélanger A (1996) Levels of plasma C19 steroids and 5 alpha-reduced C19 steroid glucuronides in primates, rodents, and domestic animals. *Am J Physiol* 271:E348–E353
117. Karatzas A, Giannatou E, Tzortzis V, Gravas S, Aravantinos E, Moutzouris G, Melekos M, Tsezou A (2010) Genetic polymorphisms in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene and prostate cancer risk in Caucasian men. *Cancer Epidemiol* 34:345–349
118. Gallagher CJ, Kadlubar FF, Muscat JE, Ambrosone CB, Lang NP, Lazarus P (2007) The UGT2B17 gene deletion polymorphism and risk of prostate cancer. A case-control study in Caucasians. *Cancer Detect Prev* 31:310–315
119. Park J, Chen L, Ratnashinge L, Sellers TA, Tanner J-P, Lee J-H, Dossett N, Lang N, Kadlubar FF, Ambrosone CB, Zachariah B, Heysek RV, Patterson S, Pow-Sang J (2006) Deletion polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B17 and risk of prostate cancer in African American and Caucasian men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:1473–1478
120. MacLeod SL, Nowell S, Plaxco J, Lang NP (2000) An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer. *Ann Surg Oncol* 7:777–782
121. Hajdinjak T, Zagradisnik B (2004) Prostate cancer and polymorphism D85Y in gene for dihydrotestosterone degrading enzyme UGT2B15: frequency of DD homozygotes increases with Gleason Score. *Prostate* 59:436–439
122. Fiorucci S, Zampella A, Distrutti E (2012) Development of **FXR**, **PXR** and **CAR** agonists and antagonists for treatment of liver disorders. *Curr Top Med Chem* 12(6):605–624
123. Ben-Ishay D, Slavin S, Levij IS, Eliakim M (1975) Obstructive jaundice associated with carcinoma of the prostate. *Isr J Med Sci* 11:838–844
124. Koruk M, Büyükberber M, Savaş C, Kadayifçı A (2004) Paraneoplastic cholestasis associated with prostate carcinoma. *Türk J Gastroenterol* 15:53–55
125. Karakolios A, Kasapis C, Kallinikidis T, Kalpidis P, Grigoriadis N (2003) Cholestatic jaundice as a paraneoplastic manifestation of prostate adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol* 1:480–483
126. Gobinet J, Auzou G, Nicolas JC, Sultan C, Jalaguier S (2001) Characterization of the interaction between androgen receptor and a new transcriptional inhibitor, SHP. *Biochemistry* 40:15369–15377
127. Jensen EV, Jordan VC (2003) The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 9:1980–1989
128. Althuis MD, Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Brinton LA, Madigan MP, Sherman ME (2004) Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1558–1568
129. Jordan VC (2004) Selective estrogen receptor modulation: concept and consequences in cancer. *Cancer Cell* 5:207–213
130. Geisler J, Lønning PE (2006) Aromatase inhibitors as adjuvant treatment of breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 57:53–61
131. Raju U, Levitz M, Javitt NB (1990) Bile acids in human breast cyst fluid: the identification of lithocholic acid. *J Clin Endocrinol Metab* 70:1030–1034

132. Javitt NB, Budai K, Miller DG, Cahan AC, Raju U, Levitz M (1994) Breast-gut connection: origin of chenodeoxycholic acid in breast cyst fluid. *Lancet* 343:633–635
133. Costarelli V, Sanders TAB (2002) Plasma bile acids and risk of breast cancer. *IARC Sci Publ* 156:305–306
134. Murray WR, Blackwood A, Calman KC, MacKay C (1980) Faecal bile acids and clostridia in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 42:856–860
135. Papatestas AE, Panvelliwalla D, Tartter PI, Miller S, Pertsem-lidis D, Aufses AH Jr (1982) Fecal steroid metabolites and breast cancer risk. *Cancer* 49:1201–1205
136. Owen RW, Henly PJ, Thompson MH, Hill MJ (1986) Steroids and cancer: faecal bile acid screening for early detection of cancer risk. *J Steroid Biochem* 24:391–394
137. Gudmundsson S, Möller TR, Olsson H (1989) Cancer incidence after cholecystectomy—a cohort study with 30 years follow-up. *Eur J Surg Oncol* 15:113–117
138. Swales KE, Korbonits M, Carpenter R, Walsh DT, Warner TD, Bishop-Bailey D (2006) The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res* 66:10120–10126
139. Journe F, Laurent G, Chaboteaux C, Nonclercq D, Durbecq V, Larsimont D, Body J-J (2008) Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. *Breast Cancer Res Treat* 107:49–61
140. Costarelli V, Sanders TAB (2002) Plasma deoxycholic acid concentration is elevated in postmenopausal women with newly diagnosed breast cancer. *Eur J Clin Nutr* 56:925–927
141. Baker PR, Wilton JC, Jones CE, Stenzel DJ, Watson N, Smith GJ (1992) Bile acids influence the growth, oestrogen receptor and oestrogen-regulated proteins of MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 65:566–572
142. Kiani S, Valizadeh B, Hormazdi B, Samadi H, Najafi T, Samini M, Dehpour AR (2009) Alteration in male reproductive system in experimental cholestasis: roles for opioids and nitric oxide overproduction. *Eur J Pharmacol* 615:246–251
143. Van Mil SWC, Milona A, Dixon PH, Mullenbach R, Geenes VL, Chambers J, Shevchuk V, Moore GE, Lammert F, Glantz AG, Mattsson L-A, Whittaker J, Parker MG, White R, Williamson C (2007) Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 133:507–516
144. Hu M, Lui SSH, Tam L-S, Li EK, Tomlinson B (2012) The farnesoid X receptor –1G>T polymorphism influences the lipid response to rosuvastatin. *J Lipid Res* 53:1384–1389
145. Marzolini C, Tirona RG, Gervasini G, Poonkuzhali B, Assem M, Lee W, Leake BF, Schuetz JD, Schuetz EG, Kim RB (2007) A common polymorphism in the bile acid receptor farnesoid X receptor is associated with decreased hepatic target gene expression. *Mol Endocrinol* 21:1769–1780
146. Kovacs P, Kress R, Rocha J, Kurtz U, Miquel JF, Nervi F, Méndez-Sánchez N, Uribe M, Bock HH, Schirin-Sokhan R, Stumvoll M, Mössner J, Lammert F, Wittenburg H (2008) Variation of the gene encoding the nuclear bile salt receptor FXR and gallstone susceptibility in mice and humans. *J Hepatol* 48:116–124
147. Watanabe M, Houten SM, Matak C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484–489
148. Mooradian AD, Shamma'a M, Salti I, Cortas N (1985) Hypophyseal-gonadal dysfunction in men with non-alcoholic liver cirrhosis. *Andrologia* 17:72–79
149. Foresta C, Schipilliti M, Ciarleglio FA, Lenzi A, D'Amico D (2008) Male hypogonadism in cirrhosis and after liver transplantation. *J Endocrinol Invest* 31:470–478
150. Houten SM, Volle DH, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Auwerx J (2007) In vivo imaging of farnesoid X receptor activity reveals the ileum as the primary bile acid signaling tissue. *Mol Endocrinol* 21:1312–1323
151. Van Thiel DH, Gavalier JS, Zajko AB, Cobb CF (1985) Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 4:616–621
152. Prawitt J, Caron S, Staels B (2011) Bile acid metabolism and the pathogenesis of type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* 11(3):160–166
153. Williamson C, Miragoli M, Sheikh Abdul Kadir S, Abu-Hayyeh S, Papacleovoulou G, Geenes V, Gorelik J (2011) Bile acid signaling in fetal tissues: implications for intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Dig Dis* 29(1):58–61
154. Milona A, Owen BM, Cobbald JF, Willemsen EC, Cox IJ, Boudjelal M, Cairns W, Schoonjans K, Taylor-Robinson SD, Klomp LW, Parker MG, White R, van Mil SW, Williamson C (2010) Raised hepatic bile acid concentrations during pregnancy in mice are associated with reduced farnesoid X receptor function. *Hepatology* 52(4):1341–1349

Annexe III

Is spermiogenesis the critical step for answering biomedical issues ? (review)

Baptissart M, Vega A, Martinot E, Volle DH,

Spermatogenesis, 2013

Male fertility

Is spermiogenesis the critical step for answering biomedical issues?

Marine Baptissart,^{1,2,3,4} Aurélie Vega,^{1,2,3,4} Emmanuelle Martinot^{1,2,3,4} and David H. Volle^{1,2,3,4,*}

¹Inserm U 1103; Génétique Reproduction et Développement (GReD); F-63177 AUBIERE, France; ²Clermont Université; Université Blaise Pascal; GReD, BP 10448; F-63000 CLERMONT-FERRAND, France; ³CNRS; UMR 6293; GReD; F-63177 AUBIERE, France; ⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne; F-63000 CLERMONT-FERRAND, France

Regarding male fertility, biomedical issues have opposite goals to treat infertility or develop contraceptive drugs. Recently, the identification of the molecular mechanisms involved in germ cell differentiation suggest that spermiogenesis has to be put at the crossroad to reach these goals.

Concerning fertility issues, citizens in our modern world are schizophrenic. On one side, couples have the possibility to control conception; and on the other side, more and more couples suffer from the misfortune of being infertile. These two societal problems lead to intensive research and conflicting government policies. However, these opposing goals rely on a better understanding of germ cell differentiation.

Male Contraception

In our society, contraception is a widely discussed topic among couples. Contraception is used by couples for family planning purposes. It is also important to reduce the number of deaths and diseases in women who have unwanted pregnancies.¹ This is why governments have contraceptive programs in place to support women with undesired pregnancies. Regarding contraception, it is rarely a question for men since the only available methods are the use of condoms and vasectomy.² The lack of male contraception is also because for men, the daily production of up to 100 million spermatozoa is a much bigger hurdle to deal

with vs. just one ovum every month in women. For male contraception, much research and efforts have been focused on hormonal approaches.^{3,4} Indeed, testicular physiology is mainly regulated by the hypothalamus-pituitary axis, which produces gonadotropins that control the endocrine (steroidogenesis) and exocrine (gamete production) functions of the testis.⁵ Both are interconnected as germ cell survival is dependent of the androgen concentrations.⁶ Thus, hormonal strategies are used to block spermatozoa production. However, a long-term impact of hormonal-based contraceptives is not known, which may expose men to health risks as demonstrated by the adverse effects of endocrine disruptors.⁷ There are also efforts in the field to block gamete production via spermatogenesis in which undifferentiated spermatogonia are expanded by consecutive cycles of mitosis, to be followed by germ cell differentiation and meiosis, and with the haploid spermatids, undergo spermiogenesis to become spermatozoa.

Another interesting question about male contraception is the accessibility of contraceptive drugs to target cells. This is important in the testis since the testis is an immune-privileged organ and it is equipped with sophisticated structures to minimize toxicity in order to protect developing germ cells. Indeed, in the testis, the blood-testicular barrier (BTB) is a structure in the seminiferous epithelium, essential for spermatogenesis.⁸ This poses a major obstacle in delivering male

Keywords: male, infertility, contraception, spermatogenesis, spermiogenesis

Submitted: 11/12/12

Revised: 02/13/13

Accepted: 02/25/13

<http://dx.doi.org/10.4161/spmg.24114>

*Correspondence to: David H. Volle;
Email: david.volle@inserm.fr

contraceptive drugs to meiotic and post-meiotic cells that are located behind the BTB. It has been established that only a small fraction of the drugs (1%) administered to adult rats via gavage could reach the testis.⁹

Thus, a better understanding of the BTB and a novel approach to disrupt the BTB specifically could facilitate male contraceptive development. In this context, adjuvin is a potent male contraceptive. It breaks down cell/cell adhesion between Sertoli and germ cells in the seminiferous epithelium, causing transient infertility.

Besides the BTB, testis also express many drug transporters that are capable of pumping drugs and/or toxicants, including male contraceptives out of the testis via efflux drug transporters.¹⁰⁻¹² More important, these efflux and influx drug transporters are also found in spermatogonia and early spermatocytes, which are located outside the BTB. In short, a better understanding of drug transporters and the BTB are critical to develop male contraceptives.

Inhibition of germ cell proliferation. Spermatogonia are the forerunners of all spermatogenesis, and some of these cells are also the “spermatogonial stem cells” of the germ cell lineage. Targeting spermatogonia is risky, as it could irreversibly affect daughter cells¹³ and progeny even after the contraception treatment has been stopped. In addition, altering the proliferation of these cells could result in tumor development.

Meiosis as the target step for contraception. The second step to focus on could be meiosis. In the last decade, knowledge about meiosis has increased. We will not give an exhaustive review, but some points are of interest for contraception.

The meiotic step is sensitive to hormonal status, as demonstrated in rodent transgenic models⁶ and by endocrine disruptors.⁷ This step of spermatogenesis could be targeted by hormonal contraception. However, such an approach may affect secondary sexual characteristics, as the hypothalamic-pituitary axis will be altered.

The entry to and progression through meiosis are under the control of the retinoid signaling pathways.^{14,15} Up until puberty, cytochrome Cyp26b1

maintains low concentrations of retinoids. At puberty, the retinoid levels increase and induce the expression of stimulated by retinoid gene-8 (Stra8), which allows germ cells entry to meiosis.

In contrast, fibroblast growth factor 9 (FGF9) suppresses entry to meiosis. FGF9 decreases the sensitivity of germ cells to retinoids. In addition, FGF9 signaling preserves the pluripotency of germ cells and promotes a male fate during embryonic development.

Retinoid and FGF9 act in concert to control mammalian germ cell sexual fate commitment.¹⁶ Developing drugs to modulate these pathways could be of interest for contraceptive issues.

During meiosis, homologous recombination allows the reciprocal exchange of genetic material between parental genomes and ensures proper chromosome segregation during the first meiotic cell division.¹⁷⁻¹⁹

Spo11, a meiosis-specific protein, introduces double-strand breaks on chromosomal DNA and sets up meiotic recombination. The spermatocytes of Spo11-/- mice fail to synapse chromosomes and progress beyond the zygotene stage of meiosis.²⁰ The Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase, activated by DNA damage, triggers checkpoint signaling and promotes DNA strand break repair in order to pass meiosis.²¹ In addition, many transgenic rodent models show altered meiosis because of a failure in chromosomal synapsis. Similarly, TEX15-deficient spermatocytes exhibit a failure in chromosomal synapsis.²² Zip4h(-/Y) mutant mice present a delay in meiotic double-strand break repair and decreased crossover formation.²³

In addition, studies have demonstrated the importance of germ cell-specific epigenetic marks in the entry to and progression of meiosis.²⁴ Interestingly, mice with a loss-of-function mutation in H3K9 histone methyltransferases are sterile, as the germ cells undergo apoptosis at the pachytene stage.^{25,26} Several proteins possess H3K9 methyltransferase activity. Suv39h1, Suv39h2 and G9a can perform H3K9 dimethylation, whereas only G9a performs H3K9 monomethylation.²⁷

MicroRNA and small RNA also play important roles in germ cell

differentiation and transmission to following generations.²⁸⁻³⁰ The correct spatial and temporal expression of germ cell-specific genes is essential to produce functional spermatozoa.³¹ Dicer 1, an RNase III endonuclease, is essential for the biogenesis of microRNAs (miRNAs) and endogenous small-interfering RNAs (endo-siRNAs). It also degrades toxic transposable elements. Early ablation of Dicer1 at the onset of male germ cell development leads to infertility caused by multiple cumulative defects. Alterations such as delayed progression of spermatocytes to prophase I and increased apoptosis were observed in the first spermatogenic wave, resulting in a reduced number of round spermatids.³²

In the future, it may be proposed to develop drugs targeting these key processes of meiosis. However, it must be ensured that these drugs will block 100% of the germ cells at meiosis; if some pass this step with incomplete DNA repair or abnormal epigenomic pattern, it could impact the development of the offspring.

Spermiogenesis as the last testicular step on which to focus. Spermatozoa production may also be blocked at spermiogenesis, the stage in which spermatocytes become haploid spermatids. During this stage, much of the cytoplasm is removed through phagocytosis by the Sertoli cells.³³ There is also a condensation of the genome following the replacement of histones by protamines.³⁴ Several post-translational modifications occur on histones during spermatogenesis. Histone H4 hyperacetylation is associated with histone removal; however, the exact mechanisms are still unclear. Finally, acrosome formation and the establishment of the flagellum lead to spermatozoa.³⁵

Recently, Matzuke et al. characterized the reversible inhibitory impact of a small molecule, 4-(4-chlorophenyl)-2,3,9-trimethyl-1,1-dimethylethylester-6H-thieno(3,2-f)(1,2,4)-triazolo(4,3-a)-(1,4)diazepine-6S-acetic acid (JQ1), on mouse fertility.³⁶ The JQ1 molecule interacts with and is an inhibitor of the bromodomain and extraterminal (BRDT) subfamily of epigenetic reader proteins.^{37,38} BRDTs are expressed during the later stages, from pachytene spermatocytes to spermatids. BRDTs colocalize and interact with acetylated H4

in elongating spermatids,³⁹ and they are involved in the marked chromatin remodeling during spermiogenesis that leads to the histone-protamine transition and nucleus condensation.

JQ1 does not have an impact on testosterone levels, which is important for the preservation of other male characteristics. In addition, it does not alter the proliferative properties of spermatogonia. Consistent with the cellular-restricted expression of Brdt1, JQ1 must act on spermatocytes and spermatids, leading to a decrease in the number of round spermatids and spermatozoa. Additionally, it affects spermatozoa quality, as analyzed by their motility.

A Long Way to Go and Many Questions to Answer Before Using Such a Contraceptive Molecule

(1) The contraceptive effect of JQ1 is reversible, but mice only recover fertility 4–6 mo after the end of treatment. The duration of spermatogenesis in mice is 35 d, compared with 74 d in humans. Six months equates to six cycles of spermatogenesis in mice, so the dose and treatment length in humans must be defined, as six cycles of spermatogenesis in humans takes longer than a year to complete.

(2) The chromatin changes associated with the use of the JQ1 molecule must be analyzed carefully to avoid harmful effects on the offspring.

(3) In their study, Matzuk et al. did not test the long-term impact of such treatment. Indeed, male contraception would imply a longer time frame than the one tested.

(4) During his reproductive life, a man may need to use such a molecule at various periods, raising the question of whether the recovery time will be the same after multiple exposures.

(5) There are several homologous members in the BRDT family. Further studies will be necessary to ensure the specificity of JQ1 on chromatin modifications during spermiogenesis. For example, BRD4 and BRDT1 show high similarity even on the JQ1-interacting domain, and BRD4 is associated with several pathologies including cancers.^{40,41}

Male Infertility

Infertility affects approximately 15% of couples. Males account for 40–50% of the cases, either alone or in combination with female pathologies.⁵ The incidence of male fertility disorders is continuously increasing and has been linked to multiple factors, including genetic and environmental factors.⁴² Several epidemiological studies associate environmental factors and toxic chemicals such as endocrine disruptors (phthalates or bisphenol-A) to male infertility.^{43,44} In parallel, at least 40% of people undergoing anticancer treatments have impaired reproductive function. Chemotherapy or radiation may impair fertility, sometimes irreversibly.⁴⁵ The fertility side effects of these treatments should be considered before beginning the treatment. However, for some patients, it is not possible to preserve the gametes, such as in children who contract cancers before puberty. In addition, it might be risky to preserve the spermatozoa of men with metastatic diseases, as there is no assurance that the germ cells have not been altered. In these cases, it may be safer to find other alternatives to restore the male fertility.⁴⁶

Infertility affects millions of people worldwide. For many people, the only possibility is to use assisted-reproductive technologies (ART). In vitro fecundation and intra-cytoplasm injection are long and difficult processes at both physical and psychological levels.⁴⁷ Furthermore, biopsy is an invasive approach and is associated with an increased risk to develop testicular cancer.⁴⁸ In some infertility cases, however, it is not possible to find either spermatozoa or elongated spermatids in testicular biopsies. In such cases, people may decide not to be the biological father of their child, which can be difficult for both the father and the children once they get older.^{49,50}

Other alternatives should be able to overcome these difficulties. The current technologies have reached their limits, leading many researchers to make efforts in developing in vitro approaches to differentiate germ cells. However, it is difficult to differentiate germ cells that are able to fertilize oocytes. The differentiation of germ cells requires specific factors

that allow pluripotent cells to enter a specific lineage. Another critical step is for germ cells to pass meiosis. At this point, the haploid cells will condense their nuclei and change their shape while forming the acrosome and the flagella, essential apparatus for motility and fertilization of the oocytes.

To circumvent these difficulties, we need to improve our knowledge of germ cell differentiation.

Protocols for the differentiation of germ cells went through several experimental steps before gaining some efficiency and were mostly performed using fetal cattle male germ cells.⁵¹ However, as fetal germ cells from humans are difficult to obtain, such approaches are hardly feasible in human clinics. Other groups managed to differentiate haploid cells from spermatogonial stem cells, but the experimental protocol, which uses fluorescence-activated cell sorting (FACS) technology to select cells that will be able to give haploid cells, is difficult to perform.⁵² Human-induced pluripotent stem cells can produce haploid germ cells.⁵³ The experimental protocol requires culture for 10 wk and the use of FACS to obtain haploid cells. However, the percentage of selected cells is low, as only 1–2% of the cultured cells are haploid.

All these data have provided many clues to better understand spermatogenesis. A recent study by Easley et al.⁵⁴ has led to a jump in the capacity to differentiate spermatogenic cells. The authors described how to obtain haploid spermatogenic cells from human foreskin fibroblasts without any genetic manipulation. Using a specific cell culture protocol, they have been able to differentiate these cells into post-meiotic round spermatids in a very short amount of time, only 10 d. In addition, this protocol is more efficient, as 4–5% of human pluripotent stem cells give haploid cells.

Although the study from Easley et al. produced some interesting results, various points need to be clarified. Ten days seems too short period to produce haploid cells compared with the classical length of spermatogenesis in human (74 d). It must be confirmed that the spermatids have been correctly differentiated. Another striking point is that a longer culture time

did not allow the authors to obtain more haploid cells; in fact, the percentage even decreased after 20 d of culture, suggesting that the other germ-like cells (VASA+) do not have the capacity to differentiate into haploid cells.

However, this protocol may allow researchers to study events during early spermatogenesis from human primordial stem cells (hPSCs) to spermatogonial stem cells (SSCs) and to characterize the events associated with spermiogenesis to the round spermatid stage. If there is a long way to go, such results highlight the need to increase our knowledge of spermatogenesis to be able to transplant germ cells that will differentiate *in vivo* in functional spermatozoa in the future.

In addition, the cells failed to perform complete spermiogenesis. This study highlights the complexity of such differentiation and identifies some critical missing factors in this experimental protocol. This research highlights the potential need for supporting cells, namely Sertoli cells, for completing spermatogenesis *in vitro*. Sertoli cells play a supportive role to germ cells and maintain spermatogenesis (Cheng et al., 2010). They form the hemato-testis barrier that isolates the germ cells from blood components, particularly immune mediators.⁵⁵ It is worth noting that these functions might not be essential for the *in vitro* differentiation of germ cells. The role of Sertoli cells as the only source of nutrients and growth factors for germinal cells is bypassed *in vitro* by adding growth factors, serum and other supplements to the medium. However, the critical role of Sertoli cells of removing germ cell cytoplasm might be missing. Co-cultures of germ cells with Sertoli cells may be helpful to help human pluripotent fibroblasts to become haploid spermatids.

Buganim and collaborators managed to differentiate fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells that are able to support germ cell survival *in vitro*.⁵⁶ The addition of such cells could help to complete germ cell differentiation. This idea is supported by data showing that *in vitro* SSC lines or any isolated SSCs can perform full spermatogenesis.⁵⁷ These data were obtained using an approach in which SSCs were transplanted into organ cultures. The

obtained haploid cells (elongated spermatids and flagellated sperm) gave rise to healthy offspring through micro-insemination. Using foreskin fibroblasts to perform co-culture of Sertoli-like cells and germ cells may be a major advance toward helping male infertility.

A Long Way to Go and Many Questions to Solve Before Differentiating Fully Competent Germ Cells

(1) Although the potential use of human foreskin fibroblasts opens a new field of research in the production of differentiated germ cells, the quality of the germ cells must be controlled before using such cells for ART. It will be necessary assess the criteria used to define differentiation. Is differentiation only morphological? Is it the correct expression of specific cell-type markers (protamine, acrosin, etc.)? Is it a specific epigenetic pattern (DNA methylation; histones/protamines)?

(2) Further tests will be needed to assure that these haploid germ cells can, at least *in vitro*, give rise to embryos.

(3) Once *in vitro* differentiation of efficient germ cells has been achieved, society will also have to address the bio-ethical challenges.

(4) The use of animal models also represents a tool for exploring the root causes of male infertility. Deriving hPSCs from infertile men will allow identification of where spermatogenesis arrests. It will be important to pre-clinically evaluate whether these *in vitro*-generated gamete forerunners have reproductive capacities *in vivo*. Re-implantation studies and analyses of embryo development *in utero* will also be necessary. As research on humans should be avoided for ethical reasons, inter-species studies will be required. Such approaches have already been performed and have succeeded between goats and mice. The use of animal models will be of major importance, as there is a large source of mouse models with altered spermatogenesis, altered Leydig or altered Sertoli functions. Approaches with transgenic models may be helpful in analyzing the cell/cell communication and paracrine factors involved in complete spermatogenesis.

Focusing Research on a Common Target to Improve ART and Contraceptive Issues?

During recent decades, there has been increasing interest in biomedical issues involving infertility and contraception.

In addition, ethical issues could alter contraceptive approaches.⁵⁸ For example, the use of condoms is associated with sex outside marriage in Africa, inhibiting their use between married couples.

Vasectomy is, of course, an irreversible method of contraception under male control. The prevalence of vasectomy varies widely around the world. Some couples that choose sterilization cite problems with other contraceptive methods. In addition, couples that choose sterilization are more likely to be older, to be married and to have children. In some countries (for example in Latin America and the Caribbean), couples that choose sterilization are more likely to be of higher socioeconomic status, while in others (for example in India and Bangladesh), they are more likely to be of lower socioeconomic status.

Attitudes toward male condoms and new contraceptive methods varied markedly according to cultural background. One study reported that men from South Africa, China and Hong Kong were less enthusiastic about hormonal contraception for men,⁵⁹ while another study reported significant cultural variations in the acceptability of hormonal contraception for men.⁶⁰ Educated men were more likely to find the idea acceptable. Those opposed to contraception either in general or because of their religious beliefs were likely to approve of male methods.

Masculinity is rarely evoked about contraceptive approaches when male alterations are involved in the decrease of fertility, particularly in the context of endocrine. If testicular biopsies can help in obtaining spermatozoa with infertility due to altered germ cell production, other approaches need to be developed. Indeed, a biopsy is an invasive approach and is associated with an increased risk for developing testicular cancer.⁴⁸ One might think that to transplant spermatogonia differentiated *in vitro* from fibroblasts might allow a man to be the biological father of his children. Of

course, such transplantation approaches could be successful only when the origin of the default is within the germ cells. If the problems come from endocrine functions or Sertoli cells for example, transplantation of spermatogonial stem cells will not have any chance to succeed. If the alterations (mutation, epigenetic information) are intrinsic to germ cells, however, transplantation could be of major interest.

Concluding Remarks

To reach these two opposite objectives of reproductive biology, the common point seems to better understand the key steps involved in spermatogenesis. Such knowledge is essential to identify the clues necessary to successfully differentiate germ cells in vitro and to identify the best contraceptive molecules.

Furthermore, obtaining in vitro differentiated spermatozoa will be less invasive than performing biopsies. The work of Easley et al. thus opens new perspectives, as the authors have been able to differentiate germ cells from pluripotent fibroblasts. However, it is still difficult to differentiate germ cells up to spermatozoa. This difficulty to pass spermiogenesis suggests that it is a key step of germ cell differentiation.

A study with the opposite purpose of generating a new contraceptive approach also highlights the importance of this step of spermatogenesis. The use of JQ1 arrests germ cell differentiation at haploid step, as shown by the decreased number of spermatids.

Both studies identify chromatin remodeling as a critical step. Epigenetic modifications are of major importance for development, as epigenetic changes can lead to embryonic death. This was shown in rodent models invalidated for genes encoding DNA-methyltransferases.⁶¹ In addition, alterations in the epigenetic pattern (DNA or histone modifications) correlate with an increased incidence of pathologies such as cancer.⁶² Increased knowledge of germ cell differentiation is necessary to avoid or to minimize impacts on the offspring, even after several generations. To restore fertility using in vitro-differentiated haploid cells, a correct

epigenetic pattern will be necessary to achieve the best rate of embryonic development in vitro and to reduce spontaneous abortions after re-implantation in females and the incidence of severe pathologies in the progeny.

The role of epigenetics in male gametes must also be evaluated. Indeed, ART approaches may lead to epigenetic modifications in the embryos developed in vitro.⁶³ Although epigenetics has not clearly been shown to have an impact on progeny development, the fact that epigenetic modifications result in developmental defects that lead to embryonic death, which could contribute to the low efficiency of ART approaches (approximately 20% success rate) cannot be excluded. A recent study suggests that epigenetic modifications during ART are normally corrected in the germ line by epigenetic reprogramming and, thus, not spread to following generations.⁶⁴ However, such impacts still need to be further studied, as rare epigenetic disorders such as Beckwith-Wiedemann syndrome or Angelman syndrome seem higher.^{65,66}

Likewise, it will be necessary to control for the quality of germ cells that will be generated after the arrest of the temporary contraception in men. This includes morphological aspects as well as classical quality criteria such as mobility and capacity to fecund. The emergence of the importance of epigenetic status in haploid germ cells indicates that these criteria will also need to be taken into consideration.

All these studies on spermatogenesis will help in developing new strategies for contraception and for new approaches for restoring fertility. From all these recent data, the identification of the molecular mechanisms involved in such a complex process will give some hints and contribute to the emergence of a new field of biomedical research. Finally, these studies suggest that spermiogenesis must be placed at the crossroads to reach the goals of the two main issues of biomedical reproductive biology, namely male contraception and male infertility.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

Lab is supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche (to M.B.), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to D.H.V.), ANR Jeune Chercheur (#1103, to D.H.V.).

References

- Palma I. Unpredicted pregnancy among Chilean young women. *Rev Med Chil* 2012; 140:319-25; PMID:22689111; <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872012000300006>.
- Piccinino LJ, Mosher WD. Trends in contraceptive use in the United States: 1982-1995. *Fam Plann Perspect* 1998; 30:4-10, 46; PMID:9494809; <http://dx.doi.org/10.2307/2991517>.
- Ilani N, Roth MY, Amory JK, Swerdloff RS, Dart C, Page ST, et al. A new combination of testosterone and nesterone transdermal gels for male hormonal contraception. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97:3476-86; PMID:22791756; <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-1384>.
- Grimes DA, et al. Steroid hormones for contraception in men. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 3:CD0043162012.
- Maqdas S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JM, Volle DH. Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol* 2012; In press; PMID:22766106; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>.
- Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 2009; 30:119-32; PMID:19176467; <http://dx.doi.org/10.1210/er.2008-0025>.
- Volle DH, Decourtis M, Garo E, McNeilly J, Fenichel P, Auwerx J, et al. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 2009; 119:3752-64; PMID:19884658; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI38521>.
- Mruk DD, Cheng CY. Delivering non-hormonal contraceptives to men: advances and obstacles. *Trends Biotechnol* 2008; 26:90-9; PMID:18191256; <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.10.009>.
- Cheng CY, Mruk D, Silvestrini B, Bonanomi M, Wong CH, Siu MK, et al. AF-2364 [1-(2,4-dichlorobenzyl)-1H-indazole-3-carboxamide] is a potential male contraceptive: a review of recent data. *Contraception* 2005; 72:251-61; PMID:16181968; <http://dx.doi.org/10.1016/j.contraception.2005.03.008>.
- Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev* 2006; 58:140-61; PMID:16714484; <http://dx.doi.org/10.1124/pr.58.2.3>.
- Mruk DD, Cheng CY. Desmosomes in the testis: Moving into an uncharted territory. *Spermatogenesis* 2011; 1:47-51; PMID:21866275; <http://dx.doi.org/10.4161/spmg.1.1.15443>.
- Su L, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Drug transporters and blood-testis barrier function. *J Endocrinol* 2011; 209:337-51; PMID:21471187; <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-10-0474>.

13. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005; 308:1466-9; PMID:15933200; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1108190>.
14. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, et al. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 2006; 312:596-600; PMID:16574820; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1125691>.
15. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103:2474-9; PMID:16461896; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510813103>.
16. Bowles J, Feng CW, Spiller C, Davidson TL, Jackson A, Koopman P. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. *Dev Cell* 2010; 19:440-9; PMID:20833365; <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.010>.
17. Zickler D, Kleckner N. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu Rev Genet* 1999; 33:603-754; PMID:10690419; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.603>.
18. Keeney S. Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr Top Dev Biol* 2001; 52:1-53; PMID:11529427; [http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153\(01\)52008-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0070-2153(01)52008-6).
19. Hunter N, Kleckner N. The single-end invasion: an asymmetric intermediate at the double-strand break to double-holliday junction transition of meiotic recombination. *Cell* 2001; 106:59-70; PMID:11461702; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00430-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00430-5).
20. Smirnova NA, Romanienko PJ, Khil PP, Camerini-Otero RD. Gene expression profiles of Spo11-/- mouse testes with spermatocytes arrested in meiotic prophase I. *Reproduction* 2006; 132:67-77; PMID:16816334; <http://dx.doi.org/10.1530/rep.1.00997>.
21. Lange J, Pan J, Cole F, Thelen MP, Jasin M, Keeney S. ATM controls meiotic double-strand-break formation. *Nature* 2011; 479:237-40; PMID:22002603; <http://dx.doi.org/10.1038/nature10508>.
22. Yang F, Eckardt S, Leu NA, McLaughlin KJ, Wang PJ. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell Biol* 2008; 180:673-9; PMID:18283110; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200709057>.
23. Adelman CA, Petrini JHJ. ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. *PLoS Genet* 2008; 4:e1000042; PMID:18369460; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000042>.
24. Matsui Y, Hayashi K. Epigenetic regulation for the induction of meiosis. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64:257-62; PMID:17131058; <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-006-6281-6>.
25. Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 2007; 26:3346-59; PMID:17599069; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601767>.
26. Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, et al. Loss of the Suv39h histone methyltransferase impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 2001; 107:323-37; PMID:11701123; [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00542-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00542-6).
27. Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, Shinkai Y. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 2007; 26:3346-59; PMID:17599069; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601767>.
28. He Z, Kokkinaki M, Pant D, Gallicano GI, Dym M. Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* 2009; 137:901-11; PMID:19318589; <http://dx.doi.org/10.1530/REP-08-0494>.
29. Suh N, Blleloch R. Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development* 2011; 138:1653-61; PMID:21486922; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.056234>.
30. Buckley BA, Burkhardt KB, Gu SG, Spracklin G, Kershner A, Fritz H, et al. A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature* 2012; 489:447-51; PMID:22810588; <http://dx.doi.org/10.1038/nature11352>.
31. Song R, Hennig GW, Wu Q, Jose C, Zheng H, Yan W. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108:13159-64; PMID:21788498; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1108567108>.
32. Romero Y, Meikar O, Papaioannou MD, Conne B, Grey C, Weier M, et al. Dicer1 depletion in male germ cells leads to infertility due to cumulative meiotic and spermiogenic defects. *PLoS One* 2011; 6:e25241; PMID:21998645; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025241>.
33. Yefimova MG, Sow A, Fontaine I, Guillemot V, Martinat N, Crepieux P, et al. Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 2008; 78:697-704; PMID:18094362; <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.107.063107>.
34. Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 2003; 111:483-8; PMID:12743712; <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-002-0227-z>.
35. Kierszenbaum AL, Rivkin E, Tres LL. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 65:33-43; PMID:17644953.
36. Matzuk MM, McKeown MR, Filippakopoulos P, Li Q, Ma L, Agno JE, et al. Small-molecule inhibition of BRDT for male contraception. *Cell* 2012; 150:673-84; PMID:22901802; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.045>.
37. Pivot-Pajot C, Caron C, Govin J, Vion A, Rousseaux S, Khochbin S. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol* 2003; 23:5354-65; PMID:12861021; <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.23.15.5354-5365.2003>.
38. Shang E, Salazar G, Crowley TE, Wang X, Lopez RA, Wang X, et al. Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis. *Gene Expr Patterns* 2004; 4:513-9; PMID:15261828; <http://dx.doi.org/10.1016/j.modgep.2004.03.002>.
39. Dhar S, Thota A, Rao MRS. Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J Biol Chem* 2012; 287:6387-405; PMID:22215678; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.288167>.
40. Rodríguez RM, Huidobro C, Urduguio RG, Mangas C, Soldevilla B, Domínguez G, et al. Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cancer. *J Mol Med (Berl)* 2012; 90:587-95; PMID:22120039; <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-011-0837-0>.
41. Alsarraj J, Hunter KW. Bromodomain-Containing Protein 4: A Dynamic Regulator of Breast Cancer Metastasis through Modulation of the Extracellular Matrix. *Int J Breast Cancer* 2012; 2012:670632; PMID:22295248; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/670632>.
42. Nordkap L, Joensen UN, Blomberg Jensen M, Jørgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 355:221-30; PMID:22138051; <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.048>.
43. Salian S, Doshi T, Vanage G. Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring--an overview. *Reprod Toxicol* 2011; 31:359-62; PMID:20965246; <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.008>.
44. Meeker JD, Ehrlich S, Toth TL, Wright DL, Calafat AM, Trisini AT, et al. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol* 2010; 30:532-9; PMID:20656017; <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.005>.
45. Kenney LB, Cohen LE, Shnorhavorian M, Metzger ML, Lockart B, Hijiya N, et al. Male reproductive health after childhood, adolescent, and young adult cancers: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2012; 30:3408-16; PMID:22649147; <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.2011.38.6938>.
46. Woodruff TJ. Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 127:108-17; PMID:21112393; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmb.2010.11.007>.
47. Fisher JRW, Hammarberg K. Psychological and social aspects of infertility in men: an overview of the evidence and implications for psychologically informed clinical care and future research. *Asian J Androl* 2012; 14:121-9; PMID:22179515; <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.72>.
48. Swerdlow AJ, Higgins CD, Pike MC. Risk of testicular cancer in cohort of boys with cryptorchidism. *BMJ* 1997; 314:1507-11; PMID:9169396; <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.314.7093.1507>.
49. Keyes MA, Sharma A, Elkins JJ, Iacono WG, McGue M. The mental health of US adolescents adopted in infancy. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162:419-25; PMID:18458187; <http://dx.doi.org/10.1001/archpedi.162.5.419>.
50. Juffer F, van Ijzendoorn MH. Behavior problems and mental health referrals of international adoptees: a meta-analysis. *JAMA* 2005; 293:2501-15; PMID:15914751; <http://dx.doi.org/10.1001/jama.293.20.2501>.
51. Dong WZ, Hua JL, Shen WZ, Dou ZY. In vitro production of haploid sperm cells from male germ cells of foetal cattle. *Anim Reprod Sci* 2010; 118:103-9; PMID:19632794; <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.018>.
52. Nolte J, Michelmann HW, Wolf M, Wulf G, Nayernia K, Meinhardt A, et al. PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. *Differentiation* 2010; 80:184-94; PMID:20810205; <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2010.08.001>.
53. Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, García-Quevedo L, et al. Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2011; 29:1186-95; PMID:21681858; <http://dx.doi.org/10.1002/stem.672>.
54. Easley CA 4th, et al. Direct Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Haploid Spermatogenic Cells. *Cell Rep* 2012; <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.015>.
55. Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol Biol* 2011; 677:459-70; PMID:20941627; http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60761-869-0_29.

56. Buganim Y, Itskovich E, Hu YC, Cheng AW, Ganz K, Sarkar S, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012; 11:373-86; PMID:22958931; <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.019>.
57. Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, et al. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471:504-7; PMID:21430778; <http://dx.doi.org/10.1038/nature09850>.
58. Glasier A. Acceptability of contraception for men: a review. *Contraception* 2010; 82:453-6; PMID:20933119; <http://dx.doi.org/10.1016/j.contraception.2010.03.016>.
59. Martin CW, Anderson RA, Cheng L, Ho PC, van der Spuy Z, Smith KB, et al. Potential impact of hormonal male contraception: cross-cultural implications for development of novel preparations. *Hum Reprod* 2000; 15:637-45; PMID:10686211; <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/15.3.637>.
60. Heinemann K, Saad F, Wiesemes M, White S, Heinemann L. Attitudes toward male fertility control: results of a multinational survey on four continents. *Hum Reprod* 2005; 20:549-56; PMID:15608042; <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deh574>.
61. Guibert S, Forné T, Weber M. Dynamic regulation of DNA methylation during mammalian development. *Epigenomics* 2009; 1:81-98; PMID:22122638; <http://dx.doi.org/10.2217/epi.09.5>.
62. Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* 2012; 150:12-27; PMID:22770212; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.
63. Le Bouc Y, Rossignol S, Azzi S, Steunou V, Netchine I, Gicquel C. Epigenetics, genomic imprinting and assisted reproductive technology. *Ann Endocrinol (Paris)* 2010; 71:237-8; PMID:20362968; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.004>.
64. de Waal E, Yamazaki Y, Ingale P, Bartolomei M, Yanagimachi R, McCarrey JR. Primary epimutations introduced during intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are corrected by germline-specific epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109:4163-8; PMID:22371603.
65. Rossignol S, Steunou V, Chalas C, Kerjean A, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet* 2006; 43:902-7; PMID:16825435; <http://dx.doi.org/10.1136/jmg.2006.042135>.
66. Talaulikar VS, Arulkumaran S. Reproductive outcomes after assisted conception. *Obstet Gynecol Surv* 2012; 67:566-83; PMID:22990460; <http://dx.doi.org/10.1097/OGX.0b013e31826a5d4a>.

Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP

Vega A, Baptissart M, Martinot E, Saru JP, Baron S, Schoonjans K, Volle DH,

Expert Opinion, 2014

EXPERT OPINION

1. Introduction
2. Experimental procedures
3. Results
4. Discussion

Hepatotoxicity induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol is maintained throughout adulthood via the nuclear receptor SHP

Aurélié Vega, Marine Baptissart, Emmanuelle Martinot, Jean-Paul Saru, Silvère Baron, Kristina Schoonjans & David H Volle[†]

[†]INSERM U 1103, Génétique Reproduction et Développement, Aubière Cedex, France

Background: Liver physiology is sensitive to estrogens, which suggests that the liver might be a target of estrogenic endocrine disrupters (EED). However, the long-term consequences of neonatal exposure to EED on liver physiology have rarely been studied. The nuclear receptor small heterodimer partner (SHP) mediates the deleterious effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol (DES) on male fertility.

Objectives: As SHP is involved in liver homeostasis, we aimed to determine whether neonatal estrogenic exposure also affected adult liver physiology through SHP. Male mouse pups were exposed to DES in the first 5 days of life.

Results: DES exposure leads to alterations in the postnatal bile acid (BA) synthesis pathway. Neonatal DES-exposure affected adult liver BA metabolism and subsequently triglyceride (TG) homeostasis. The wild-type males neonatally exposed to DES exhibited increased liver weight and altered liver histology in the adult age. The use of deficient male mice revealed that SHP mediates the deleterious effects of DES treatment. These long-term effects of DES were associated with differently timed alterations in the expression of epigenetic factors.

Conclusions: However, the molecular mechanisms by which neonatal exposure persist to affect the adult liver physiology remain to be defined. In conclusion, we demonstrate that neonatal DES exposure alters adult hepatic physiology in an SHP-dependent manner.

Keywords: estrogenic endocrine disrupter, liver, small heterodimer partner

Expert Opin. Ther. Targets [Early Online]

1. Introduction

The small heterodimer partner (SHP, also known as NR0B2) is a member of the nuclear receptor (NR) superfamily and has been demonstrated to play important roles in liver physiology. SHP is primarily known for its functions in the regulation of bile acid (BA) homeostasis. This role was unequivocally established by the characterization of *Shp*-deficient mouse models [1,2]. Additionally, SHP also regulates hepatic gluconeogenesis [3,4] and lipid metabolism [5]. SHP is an atypical NR that lacks a DNA-binding domain [6] whose functions have been linked to its ability to repress the transcriptional activity of other NRs such as the liver homolog-1 (LRH-1; NR5A2) [7] and the liver X receptor α (LXR α ; NR1H3) [8]. Additionally, several lines of evidence have highlighted the crosslinks between SHP and the estrogen signaling pathways. SHP interacts and inhibits the transcriptional activity of the estrogen receptors (i.e., Er α / β and Nr3a1/2) [9]. Additionally, *Shp* is a direct target

informa
healthcare

gene of both ERs [10]. Moreover, a portion of the estrogenic effects of diethylstilbestrol (DES) in the testis might be mediated through SHP [11].

The liver has been defined as a target of estrogenic signaling pathways. Estrogens have bivalent effects on liver physiology [12]. Some positive effects have been reported; for example, total estrogen receptor alpha (ER- α) knockout mice exhibit hepatic insulin resistance [13,14]. The loss of ER- α in the liver has also been associated with hepatic steatosis and inflammation [15]. Estrogens can inhibit CCL₄-induced hepatic injury through the induction of hepatic miR-29 [16]. Moreover, estrogens have a protective effect against the development of liver cancer [17]. However, deleterious effects of estrogens have also been reported; for example, estrogen have been associated with cholestasis pathology [18,19]. Estrogen-induced cholestasis is a common form of cholestasis syndromes [20]. Estrogen-induced hepatotoxicity in rodent models is mediated through hepatic ER- α [12]. Moreover, 5 days of exposure to supra-physiological doses of 17 α -ethynylestradiol (EE2) altered synthesis pathways and uptake and efflux of BAs and cholesterol in mice [19,21].

In utero and/or early postnatal development has been demonstrated to be highly sensitive to exposure to estrogen-like EDs such as estradiol benzoate and DES [22]. To define the involvement of SHP in the effects of estrogenic EDs on liver physiology, wild-type (*Shp*^{+/+}) and *Shp* null (*Shp*^{-/-}) males were exposed to DES during early post-natal life. Here, we show that at early postnatal ages, DES exposure affected the BA synthesis pathway. Additionally, in adulthood, the DES-treated males exhibited increases in liver weight that were correlated with higher proliferation rates. Neonatal exposure to DES also affected adult BA metabolism and subsequently affected triglyceride (TG) homeostasis. These effects are mediated through the regulation of genes involved in BA synthesis, efflux, and/or catabolism. The persistence of neonatal exposure in adult physiology was associated with the altered expression of several epigenetic factors. These adult effects were mediated by SHP, as evidenced by the finding that the effects of DES treatment were less severe in the *Shp*^{-/-} male mice.

2. Experimental procedures

2.1 Animals

The mice used have been previously described [7], were maintained on a mixed 129sv/C57BL/6J background (50 – 50%), and were housed in temperature-controlled rooms on a 12 h light/dark cycle. Based on the previous studies [19,11], the mice were treated (subcutaneous injection) on the first 5 days of life (5 μ l per day) with vehicle (corn oil, MP Bio-medicals, France) or DES (0.75 or 5 μ g/pup/day; Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). The mice were sacrificed either at postnatal 10 day or at 10-weeks old.

This study was conducted in accordance with the current regulations and standards approved by the Animal Care

Committee (CEMEA Auvergne; based on the protocol CE 59-12). The protocol was performed as documented previously (28).

2.2 Histology

The livers were collected, formalin-fixed, and embedded in paraffin, and 5- μ m-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin (n = 6 – 10 animals per group).

2.3 Immunohistochemistry

Paraffin sections of PFA-4% fixed liver were sectioned at 5 μ m. The sections were mounted on positively charged glass slides (Superfrost plus), deparaffinized, rehydrated, treated for 20 min at 93 – 98°C in citric buffer (0.01 M, pH 6), rinsed in osmosed water (2 \times 5 min), and washed (2 \times 5 min) in Tris-buffered saline. Immunohistochemistry was conducted according to the manufacturer's recommendations as described earlier [23]. The slides were then counterstained with Hoestch medium (1 mg/ml). The Ki-67 antibody (M3064, Spring Bioscience, Pleasanton, CA) was used.

2.4 BA measurements

Liver BAs were analyzed in acetonitrile-deproteinized samples [24]. The qualitative measurements of the BAs in the liver extracts were performed using CrystalChem (Downers Grove, IL, USA) ELISA kits (Cat# 80470) following the manufacturer's recommendations.

2.5 Triglyceride measurements

The liver lipids were extracted as previously described [25]. The TGs were measured using a commercial kit (Diagnostic System, Holzheim Germany).

2.6 Real-time RT-PCR

RNA from the liver samples was isolated using Nucleospin RNA L (Macherey-nagel, Hoerd, France). cDNA was synthesized from the total RNA with the MMLV reverse transcriptase and random hexamer primers (Promega, Charbonnière Les Bains, France). The real-time PCR measurements of the individual cDNAs were performed using SYBR green dye (Master mix Plus for SYBR Assay, Eurogentec, Angers, France) to measure the duplex DNA formation with the EppendorfRealplex system. The sequences of primers are reported in the supplemental data as Supplemental Table 1. Standard curves were generated with pools of liver cDNAs from the animals with different genotypes and/or treatments. The results were analyzed using the $\Delta\Delta$ ct method.

2.7 Western blot

Proteins were extracted from the tissues using lysis buffer containing the following: 20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 200 μ M EDTA in 25% de glycerol, and 1X protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). The antibodies used in this study were as follows: ACTIN (Sigma Aldrich A2066) and CYTOKERATINE-8 (CK8)

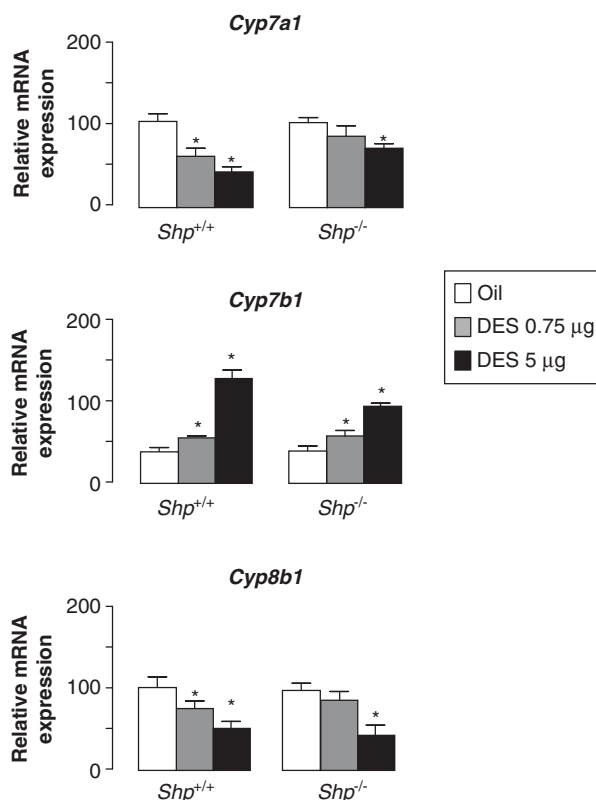


Figure 1. Neonatal exposure to DES alters expression of genes involved in bile acid synthesis. mRNA expression of *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, and *Cyp7b1* normalized to β -actin levels in liver of 10 day-postnatal *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle, 0.75 μ g or 5 μ g of DES. mRNA expression of *Cyp7a1*, *Cyp8b1*, and *Cyp7b1* normalized to β -actin levels in liver of 10 day-postnatal *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle, 0.75 μ g or 5 μ g of DES. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: * p < 0.05 versus control diet group; n = 6 – 10 per group.

DES: Diethylstilbestrol.

(Santa-Cruz, sc-52324). These antibodies were used in TBS, 0.1% tween and 10% milk.

2.8 Statistics

For statistical analysis, 2-way ANOVAs were performed. When significant effects of treatment or genotype or their interactions were obtained, multiple comparisons were made with Tukey's test. All numerical data are presented as the means \pm the SEMs. A p value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1 Neonatal exposure to DES altered the BA synthesis pathway

The hepatotoxicity induced by estrogenic compounds in the adult has been associated with alterations of the expressions of genes involved in BA synthesis [19]. Consistent with these results, neonatal exposure to DES at both of the doses used induced decreases in mRNA accumulation of *Cyp7a1* and *Cyp8b1*, whereas the expression of *Cyp7b1* was increased (Figure 1A). Interestingly, these effects of neonatal DES

exposure were less pronounced in the *Shp*^{-/-} males, as *Cyp7a1* and *Cyp8b1* were affected only at the dose of 5 μ g of DES in these animals (Figure 1A and B).

3.2 Neonatal exposure to DES alters adult BA xenobiotic metabolism

Neonatal endocrine disrupter (ED) exposure has been demonstrated to induce abnormalities in adult that result in different pathologies such as infertility [26,27]. We wondered similar effects could be observed regarding liver physiopathology. Thus, we measured liver BA levels in response to DES exposure. The BA concentrations were significantly increased by both doses of DES in the *Shp*^{+/+} mice but not in *Shp*^{-/-} mice (Figure 2A). BA homeostasis could potentially be altered at several levels, including synthesis, uptake and/or efflux. Because the effects of DES on BA levels were observed with the lower dose used (0.75 μ g), we decided to focus on this dose to decipher the involved mechanisms. Neonatal exposure to 0.75 μ g of DES was associated with decreased expression of genes involved in BA synthesis and those encoding cytochromes *Cyp8b1*, *Cyp7b1*, and *Cyp27a1* (Figure 2B), whereas

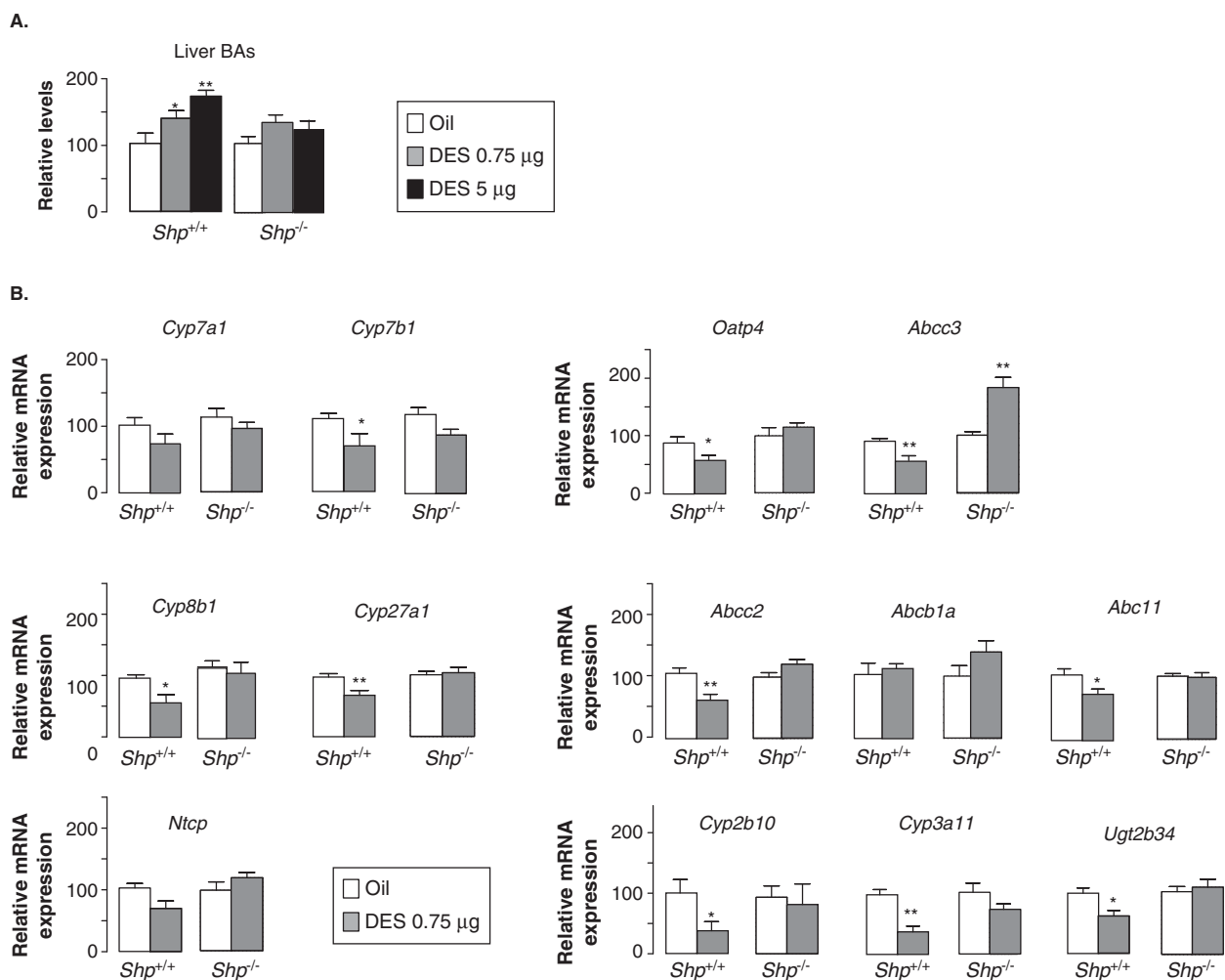


Figure 2. Neonatal exposure to DES alters adult bile acid metabolism. A. Liver relative concentrations of bile acids of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle, 0.75 µg or 5 µg of DES. **B.** mRNA expression of *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, *Cyp8b1*, *Cyp27a1*, *Ntcp*, *Oatp4*, *Abcc3*, *Abcc2*, *Abcb1a*, *Abcb11*, *Bsep*, *Cyp2b10*, *Cyp3a11*, and *Ugt2b34* normalized to β -actin levels in liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: * p < 0.05 versus control diet group; n = 6 – 10 per group.

no effect on *Cyp7a1* mRNA accumulation was observed (Figure 2B). No alterations were observed in terms of mRNA accumulation of the *Na⁺-taurocholate-cotransporting polypeptide* (*Ntcp*), which is a protein that is involved in BA uptake (Figure 2B). Additionally, DES affected the efflux of BA either in the bile or in the circulation as evidenced by the decreased expressions of *Organic anion transporting polypeptide 4* (*Oatp4*), *ATP-binding cassette sub-family c member 3* (*Abcc3*), *Abcc2*, *Abcb1a*, and *Abcb11* (Figure 2B). Finally, BA and xenobiotic homeostases might also have compromised as shown by the accumulation of the mRNAs of genes involved in their catabolism. *UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34* (*Ugt2B34*), *Cyp3a4*, and *Cyp2b10* were decreased specifically in the wild-type males treated with DES (Figure 2B).

The main role of SHP in these alterations of metabolism following DES exposure is supported by the lack of effects on the liver BA levels and on most of the analyzed genes in the *Shp*^{-/-} males (Figure 2A and B).

3.3 Neonatal exposure to DES alters TG metabolism. We then sought to define the effects of the increased hepatic BA levels

In the liver, TG synthesis has been defined to be a target of BA through the FXR-SHP-LXR-*Srebp1c* pathway [5]; thus, we analyzed TG homeostasis in livers exposed to DES. At the molecular level, the mRNA accumulations of *Diglyceride acyltransferases 1 and 2* (*Dgat1/2*), *Fatty-acid synthase* (*Fasn*), and *Acetyl-CoA carboxylase* (*Acc*) were unchanged

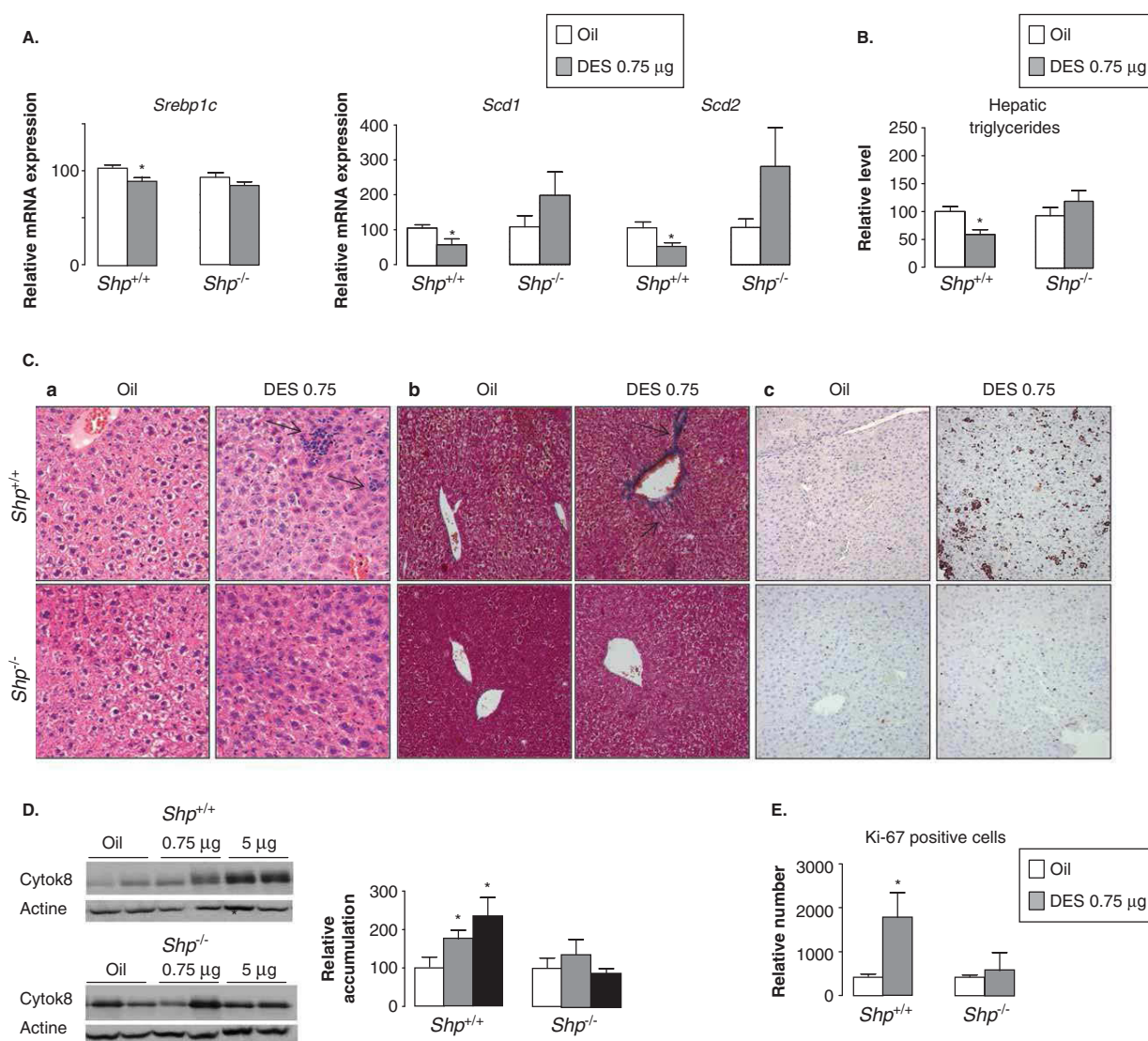


Figure 3. Neonatal exposure to DES alters adult TG metabolism. **A.** mRNA expression of *Srebp1c*, *Scd1*, and *Scd2* normalized to β -actin levels in liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. **B.** Liver relative concentrations of TGs of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. **C.** a: representative micrographs of hematoxylin/eosin-stained liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to veh or 0.75 µg of DES. Arrows indicate lymphocytes infiltration. b: representative micrographs of Trichrome de asson-stained liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. Arrows indicate fibrotic area. c: representative micrographs of Ki67-stained liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. **D.** Immunoblot of CK8 protein accumulations compared to ACTIN performed on liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. Quantification of CK8 protein accumulations compared to ACTIN. **E.** Quantification of the number of Ki-67 stained cells per slide in adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 µg of DES. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *p < 0.05 versus control diet group; n = 6 – 10 per group. CK8: Cytokeratine 8; DES: Diethylstilbestrol.

compared to the control group (data not shown). In contrast, the mRNA accumulations of *Sterol Regulatory Element-Binding Protein1c* (*Srebp1c*), *Stearoyl-coA-desaturase 1* and *2* (*Scd1* and *Scd2*) were found to be decreased in the DES-

treated *Shp*^{+/+} animals (Figure 3A). The expressions of the studied genes were not altered following DES exposure in the *Shp*^{-/-} males (Figure 3A). Consistent with the gene expression pattern, the *Shp*^{+/+} mice exhibited reduced hepatic TG

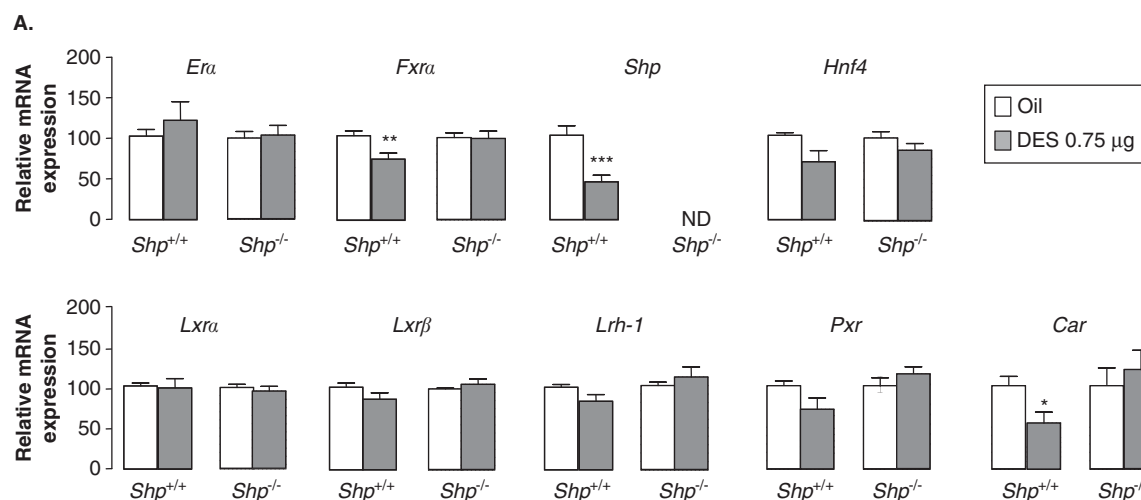


Figure 4. Neonatal exposure to DES alters mRNA accumulation of several nuclear receptor involved in liver physiology. mRNA expression of *Erα*, *Fxrα*, *Shp*, *Hnf4*, *Lxrα*, *Lxrβ*, *Lrh-1*, *Pxr*, and *Car* normalized to β -actin levels in liver of adult *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle, 0.75 μ g or 5 μ g of DES. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: *p < 0.05 versus control diet group; n = 6 – 10 per group.

DES: Diethylstilbestrol.

upon DES exposure, whereas no effect was observed in the *Shp*^{-/-} mice (Figure 3B).

3.4 Neonatal exposure to DES alters adult liver histology

To continue the phenotyping of the livers exposed to DES, we analyzed them at the histological level. Neonatal exposure of the *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} males to DES produced no significant effects on adult body weight even at the high dose of DES (Supplemental Figure 1A). DES exposure led to a significant increase in liver weight in the *Shp*^{+/+}, whereas no significant effect was observed in the *Shp*^{-/-} males even at the higher dose of DES (Supplemental Figure 1A). In the 10-week-old adult *Shp*^{+/+} mice that were neonatally exposed to DES, the livers exhibited morphological alterations including the infiltration of lymphocytes (Figure 3C) and the presence of fibrotic areas (Figure 3C). These findings were further supported by the increased expression of CK8, a marker of liver injury (Figure 3D). The same results were obtained for the higher 5 μ g dose (Figure 3D). No effects on the *Shp*^{-/-} mice were observed even at the 5 μ g DES dose (Figure 3C and D).

The increase in liver weight could have resulted from several mechanisms. No effect of DES exposure was observed on the rates of apoptosis in either the *Shp*^{+/+} or *Shp*^{-/-} males (data not shown). In contrast, immunohistochemistry for Ki-67, a marker of the cell cycle, revealed that the livers of the *Shp*^{+/+} DES-treated group exhibited a greater proliferation rate compared to the vehicle-treated animals (Figure 3C). The *Shp*^{-/-} males exhibited reduced sensitivity to DES

exposure because the proliferation rate was not increased in these animals (Figure 3E).

3.5 The expressions of several NRs involved liver physiology are sensitive to neonatal exposure to DES

To define the altered signaling pathways that were potentially involved in the effects on DES on the liver, we studied the expressions of different NRs that are known to play critical roles in this process. In the wild-type males, no effects were observed on the mRNA accumulations of *Erα*, *Lrh-1*, *Lxrα* or *Lxrβ*. In contrast, the mRNA accumulations of *Hepatocyte Nuclear Factor-4 (Hnf4)*, *Shp*, and *Fxrα* were significantly decreased in DES-treated groups (Figure 4A). Additionally, the expressions of *Car* and *Pxr*, which are two NRs that are responsive to DES, were found to be decreased in the *Shp*^{+/+} males. No effects were observed in the *Shp*^{-/-} males.

3.6 The expressions of epigenetic factors are sensitive to neonatal exposure to DES

It could be hypothesized that the altered liver metabolism in the early postnatal age are responsible for the alterations in adult. However, the low sensitivity of the *Shp*^{-/-} males to DES-treatment during postnatal development does not favor of this hypothesis. Indeed, the effects of 5 μ g DES on the expressions of *Cyp7a1*, *Cyp7b1*, and *Cyp8b1* in the 10dpn *Shp*^{-/-} males were not associated with altered BA levels in the adults. These findings suggest that other SHP-dependent mechanisms must be involved. As epigenetic mechanisms have been demonstrated to be key factors in the long-term effects of EDs [27], we analyzed critical factors in epigenetic

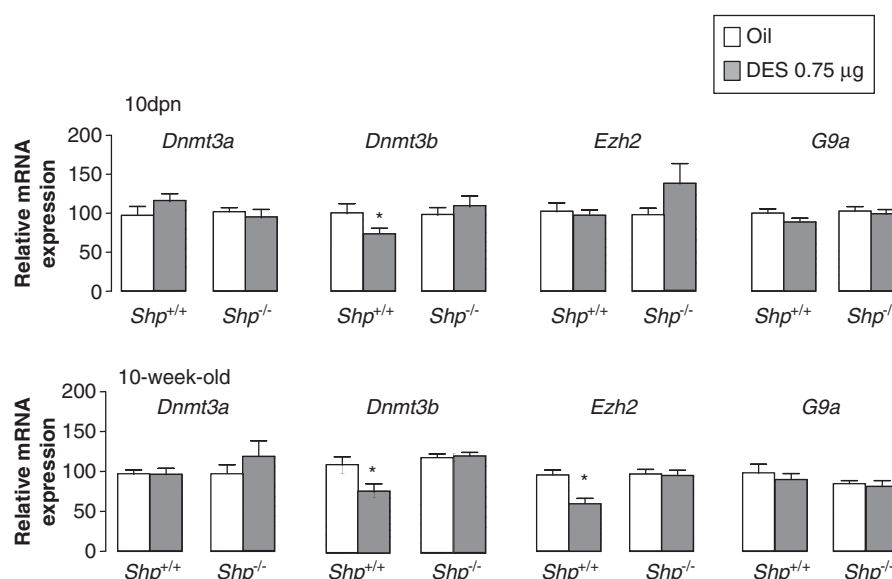


Figure 5. Neonatal exposure to DES alters mRNA accumulation of epigenetic factors. (A) mRNA expression of *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Ezh2*, *G9a* normalized to β -actin levels in liver of 10 dpn pups or 10-week-old *Shp*^{+/+} and *Shp*^{-/-} mice exposed neonatally to vehicle or 0.75 μ g of DES. In all of the panels data are expressed as the means \pm SEM. Statistical analysis: * $p < 0.05$ versus control diet group; $n = 6 - 10$ per group.

DES: Diethylstilbestrol.

processes. The expressions of *Euchromatic Histone-lysine N-MethylTransferase 2* (*Ehmt2*; *G9a*), *DNA methyltransferase-1* (*Dnmt1*), *Dnmt2*, and *Dnmt3a* were not affected by DES exposure either at 10-days postnatal (dpn) or in adulthood (Figure 5). Regarding histone modifications, the accumulation of *Enhancer of Zeste homolog-2* (*Ezh2*) mRNA was decreased in the adult livers of the *Shp*^{+/+} males, whereas no effect was observed at 10 dpn (Figure 5). Additionally, *Dnmt3b* mRNA accumulation was found to be decreased in the DES-treated *Shp*^{+/+} males at both of the ages studied. No effects were observed in the *Shp*^{-/-} mice (Figure 5). However, no modifications of global epigenetic markers were observed in the DES-treated animals (data not shown) suggesting additionally gene-specific alterations.

4. Discussion

Previous studies have reported the causal links between steroid hormones (androgens and estrogens) and liver diseases such as hepatocarcinoma [28] and cholestasis [29]. These relationships suggest that steroid pathways might play important roles in liver pathophysiology in the context of exposure to EDs.

The present study showed that neonatal exposure to an estrogenic compound altered the expressions of the genes involved in BA synthesis. Neonatal exposure to DES was associated with decreases in *Cyp7a1* and *Cyp8a1* expression, whereas *Cyp7b1* expression was increased. Interestingly, these effects were partly dependent on SHP because the as *Shp*^{-/-} males were sensitive to the higher dose of DES. These results

are consistent with those of previous study that showed that the effects of DES treatment in early postnatal life on the testes are SHP-independent [11]. These data suggest that SHP might not be a critical factor in liver and testes physiology in the context of estrogen exposure during early postnatal development.

In the adults, the involvement of SHP was supported by the lack of effect of DES exposure on the *Shp*^{-/-} males. In the *Shp*^{+/+} males, the BA metabolism was altered by DES-treatment through an effect on the BA synthesis pathway and on the catabolism and efflux of the BAs. The altered liver secretion of BAs was supported by the fact that the serum BA levels were not altered (data not shown). The significance of BA-elevation in liver was supported by the altered TG metabolism in response to neonatal exposure to DES.

Regarding the molecular signaling pathways, we demonstrate that, in the *Shp*^{+/+} males, DES affected the expressions of *Shp*, *Fxr α* , and *Hnf4*, which are important regulators of liver physiology [4,30]. Additionally, DES led to reduced mRNA accumulations of the Constitutive Androstane Receptor (CAR, NR1I3) and the Pregnane X Receptor (PXR; NR1I2) in the *Shp*^{+/+} males, whereas no effects were observed in the *Shp*^{-/-} mice. These findings are consistent with the effect of DES on *Cyp3a4* and *Cyp2b10*, which are two target genes of CAR or PXR [31,32].

It could be hypothesized that the altered liver metabolism in the early postnatal age is responsible of the alterations observed in adulthood. However, the sensitivity of the *Shp*^{-/-} males to DES-treatment during postnatal development does not favor this hypothesis. Thus, to establish the link between neonatal

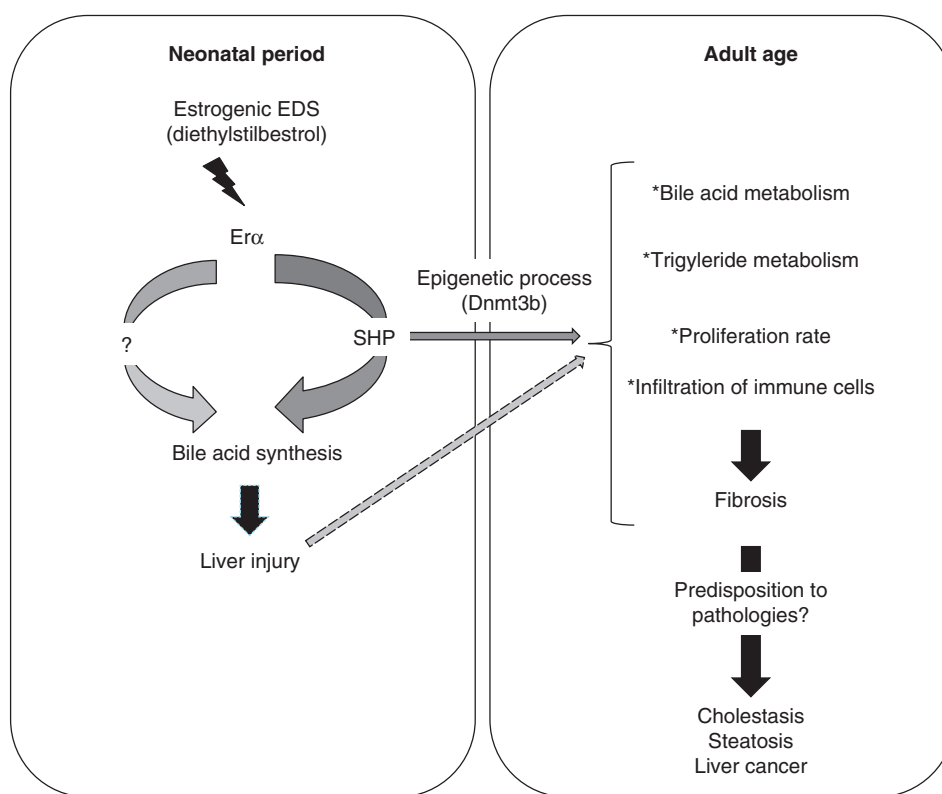


Figure 6. Proposed model. Estrogen-like EDs act through the activation of $ER\alpha$ altering genes involved in BA synthesis which in turn induced hepatotoxicity. Here we demonstrate that in neonatal age, these effects are SHP partly dependent suggesting SHP-independent mechanisms (left part). Interestingly, the neonatal exposure is associated with impacts on adult liver physiology as shown by altered BA and TG metabolisms as well as liver histology and proliferation rate. However, it could be assume that these phenomena in adult are not due to the alteration of BA metabolism in neonatal life, as there is a clear difference in the involvement of SHP at these different ages. This suggests that other mechanisms, may be through epigenetic factors, could be involved.

BA: Bile acids; ED: Endocrine disrupter; SHP: Small heterodimer partner; TG: Triglyceride.

exposure and permanent alterations in liver physiology following DES exposure, we analyzed epigenetic factors. Indeed, epigenetic mechanisms have been demonstrated to be key factors of the long-term effects of EDs [27]. Moreover, key metabolic genes involved in glucose and lipid metabolism are controlled by epigenetic processes [33,34]. Similarly, some of the epigenetic genes involved in histone modifications and DNA methylation were found to be altered following DES-exposure. Among these genes, it has previously been demonstrated that the levels of *Dnmt3b* are decreased in the seminal vesicles of animals exposed to DES [35]. Interestingly it has been suggested that alterations of *Dnmt3b* can modify liver metabolism [36]. To decipher the molecular mechanisms involved in this process, additional ChIP-seq experiments will be necessary to define the specific target genes that are altered by the down-regulation of *Dnmt3b* in the context of DES exposure.

The etiologies of liver pathologies remain difficult to establish. The significance of the effects of early postnatal exposures on later adult outcomes of liver disease is supported by the fact that the onsets of liver diseases are insidious, and there are often

latent periods between the occurrence of the disease and its detection due to hepatic decompensation. Our results are interesting regarding the hypothesis of the developmental origin of health and diseases. Thus, the present work demonstrates that the history of exposure to EDs during early life needs to be taken into consideration as it affects adult liver physiology.

The present study supports this later effect of estrogenic exposure on liver physiology as shown by the increases in liver weight and CK8 protein accumulation following DES exposure. Interestingly, CK8 is a marker of liver injury [37,38]. Additionally, the overexpression of CK8 has been described in hepatocarcinomas in mice and humans [39,40]. Consistent with this potential pro-carcinogenic property of CK8, we showed that the livers of the mice that were exposed to DES exhibited increased proliferation rates, which could predispose them to cancer development at older ages.

This work leads us to propose a model for the actions of estrogen-like ED on liver physiology at different ages (Figure 6). As demonstrated previously for estrogens [19], estrogen-like ED might act through the activation of $ER\alpha$

to alter genes involved in BA synthesis, which in turn induces hepatotoxicity. Here, we demonstrated that, at the neonatal stage and at the lower dose, these effects were partially dependent on SHP (Figure 6, left part). Interestingly, the neonatal exposure was associated with the effects on the liver physiology as shown by the SHP-dependent alterations in BA and TG metabolism and liver histology and proliferation rate. However, we assume that these phenomena in the adult are not completely determined by alterations of BA metabolism during neonatal life, as there were clear differences in the involvement of SHP at these different ages. Indeed, SHP is a critical factor during adulthood (Figure 6, right part), whereas this is less the case in early postnatal life.

Taken together, these data demonstrate that exposure to estrogenic EDs during the neonatal period alters liver physiology and could open a new field of research regarding the developmental origin of adult liver diseases, such as steatosis,

cholestasis, and cancer. Moreover, we defined the role of SHP as a critical factor in the link between neonatal estrogenic signaling pathways and subsequent liver pathophysiology in adulthood.

Declaration of interest

The DH Volle team is supported by grants from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (to M Baptissart), Ligue contre le Cancer (Comité Puy de Dôme to DH Volle), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to DH Volle), and ANR Jeune Chercheur (#1103 to DH Volle). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (●) or of considerable interest (●●) to readers.

- Hartman HB, Lai K, Evans MJ. Loss of small heterodimer partner expression in the liver protects against dyslipidemia. *J Lipid Res* 2009;50:193-203
- Zhang Y, Xu P, Park K, et al. Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. *Hepatology* 2008;48:289-98
- Yamagata K, Daitoku H, Shimamoto Y, et al. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J Biol Chem* 2004;279:23158-65
- Zhang Y, Hagedorn CH, Wang L. Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:893-908
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest* 2004;113:1408-18
- **Identification of the impact of bile acid (BA) pathway on triglyceride (TG) synthesis in the liver.**
- Seol W, Choi HS, Moore DD. Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol Endocrinol* 1995;9:72-85
- **Identification of small heterodimer partner (SHP) as member of nuclear receptor (NR) superfamily.**
- Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, et al. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev* 2007;21:303-15
- Brendel C, Schoonjans K, Botrugno OA, et al. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 2002;16:2065-76
- Johansson L, Thomsen JS, Damdimopoulos AE, et al. The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J Biol Chem* 1999;274:345-53
- **Identification of SHP as co-repressor of ERs.**
- Lai K, Harnish DC, Evans MJ. Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 2003;278:36418-29
- **Identification of Shp as a target gene of estrogen receptor alpha.**
- Volle DH, Decourteix M, Garo E, et al. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest* 2009;119:3752-64
- **Identification of SHP as a key mediator of the deleterious effects of estrogenic endocrine disrupters.**
- Matic M, Bryzgalova G, Gao H, et al. Estrogen signalling and the metabolic syndrome: targeting the hepatic estrogen receptor alpha action. *PLoS One* 2013;8:e57458
- **Study on the links between estrogen signalling pathways and metabolic diseases.**
- Ribas V, Nguyen MTA, Henstridge DC, et al. Impaired oxidative metabolism and inflammation are associated with insulin resistance in ERalpha-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E304-19
- Bryzgalova G, Gao H, Ahren B, et al. Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 2006;49:588-97
- Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, et al. Estrogen deficiency worsens steatohepatitis in mice fed high-fat and high-cholesterol diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011;301:G1031-43
- Zhang Y, Wu L, Wang Y, et al. Protective role of estrogen-induced miRNA-29 expression in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *J Biol Chem* 2012;287:14851-62
- Bigsby RM, Caperell-Grant A. The role for estrogen receptor-alpha and prolactin receptor in sex-dependent DEN-induced liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2011;32:1162-6
- **Identification of links between ERalpha and liver diseases.**
- Azer SA, Canfield PJ, Stacey NH. Hepatoprotection in ethinylestradiol-treated rats is provided by tauroursodeoxycholic

- acid, but not by ursodeoxycholic acid. *J Gastroenterol Hepatol* 1995;10:261-9
- **Study on the deleterious effects of estrogen on liver.**
19. Yamamoto Y, Moore R, Hess HA, et al. Estrogen receptor alpha mediates 17alpha-ethynylestradiol causing hepatotoxicity. *J Biol Chem* 2006;281:16625-31
 - **Identification of the negative effect of ERalpha pathways and hepatotoxicity.**
 20. Leslie KK, Reznikov L, Simon FR, et al. Estrogens in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Obstet Gynecol* 2000;5:372-6
 - **Study on the impact of estrogen in cholestasis.**
 21. Parini P, Angelin B, Stavréus-Evers A, et al. Biphasic effects of the natural estrogen 17beta-estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(7):1817-23
 - **Article on the biphasic effects of estrogens on liver.**
 22. Reed CE, Fenton SE. Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2013;9:134-46
 23. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol* 2007;1:1014-27
 24. Baptissart M, Vega A, Martinot E, et al. Bile acids alter male fertility through TGR5 signaling pathways. *Hepatology* 2014;60(3):1054-65
 25. Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, et al. Oxysterol nuclear receptor LXRbeta regulates cholesterol homeostasis and contractile function in mouse uterus. *J Biol Chem* 2007;282:4693-701
 26. Oumeddour A, Viennois E, Caira F, et al. Liver X receptors interfere with the deleterious effect of diethylstilbestrol on testicular physiology. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;46:656-62
 27. Vega A, Baptissart M, Caira F, et al. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:150
 - **Review on the impact of endocrine disrupters (EDs) on epigenetic and testicular cancer.**
 28. Kalra M, Mayes J, Assefa S, et al. Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008;4:5945-61
 29. Chen J, Zhao K, Liu GB. Estrogen-induced cholestasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Hepatogastroenterology* 2013;60:1289-96
 30. Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. *Hepatology* 2003;37:1249-53
 31. Xie Y, Hao H-P, Wang H, et al. Reversing effects of silybin on TAA-induced hepatic CYP3A dysfunction through PXR regulation. *Chin J Nat Med* 2013;11:645-52
 32. Beigneux AP, Moser AH, Shigenaga JK, et al. Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;293:145-9
 33. Ferrari A, Fiorino E, Giudici M, et al. Linking epigenetics to lipid metabolism: focus on histone deacetylases. *Mol Membr Biol* 2012;29:257-66
 - **This show the links between epigenetic and lipid metabolism.**
 34. Teperino R, Schoonjans K, Auwerx J. Histone methyl transferases and demethylases; can they link metabolism and transcription? *Cell Metab* 2010;12:321-7
 - **Dealing with the role of epigenetic factors and metabolism.**
 35. Li Y, Hamilton KJ, Lai AY, et al. Diethylstilbestrol (DES)-stimulated hormonal toxicity is mediated by ERα alteration of target gene methylation patterns and epigenetic modifiers (DNMT3A, MBD2, and HDAC2) in the mouse seminal vesicle. *Environ Health Perspect* 2014;122:262-8
 - **This article show the impact of diethylstilbestrol on Dnmt3b expression.**
 36. Takahashi M, Kamei Y, Ehara T, et al. Analysis of DNA methylation change induced by Dnmt3b in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434:873-8
 - **This article highlights the links between Dnmt3b and liver homeostasis.**
 37. Zhao S, Chu Y, Liu E. [Expression of keratin 8 in carbon tetrachloride-induced liver injury of mice]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010;39:37-42
 38. Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, et al. Mallory body formation in primary biliary cirrhosis is associated with increased amounts and abnormal phosphorylation and ubiquitination of cytokeratins. *J Hepatol* 2003;38:387-94
 39. Kushida M, Kamendulis LM, Peat TJ, Klaunig JE. Dose-related induction of hepatic preneoplastic lesions by diethylnitrosamine in C57BL/6 mice. *Toxicol Pathol* 2011;39:776-86
 40. Kakehashi A, Inoue M, Wei M, et al. Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;238:71-9

Affiliation

Aurélien Vega^{1,2,3,4}, Marine Baptissart^{1,2,3,4}, Emmanuelle Martinot^{1,2,3,4}, Jean-Paul Saru^{1,2,3,4}, Silvere Baron^{1,2,3,4}, Kristina Schoonjans⁵ & David H Volle^{†1,2,3,4}

[†]Author for correspondence

¹INSERM U 1103, Génétique Reproduction et Développement (GrED), BP 80026, F-63171 Aubière Cedex, France
Tel: +33 4 73407415;
Fax: +33 4 73407042;

E-mail: david.volle@inserm.fr
²Clermont Université, Université Blaise Pascal, GrED, F-63171 Aubière Cedex, France
³CNRS, UMR 6293, GrED, F-63171 Aubière Cedex, France

⁴Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France
⁵Institute of Bioengineering, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Faculty of Life Sciences, CH-1015 Lausanne, Switzerland

Supplementary materials available online

Supplemental Table 1 and Figure 1A.

Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures (review)

Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro JMA, Volle DH,

Frontiers in endocrinology, 2012



Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures

Aurelie Vega^{1,2,3,4}, Marine Baptissart^{1,2,3,4}, Françoise Caira^{1,2,3,4}, Florence Brugnon^{1,2,3,4}, Jean-Marc A. Lobaccaro^{1,2,3,4} and David H. Volle^{1,2,3,4}*

¹ Génétique Reproduction et Développement, INSERM U 1103, Aubière, France

² Génétique Reproduction et Développement, Clermont Université, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France

³ Génétique Reproduction et Développement, CNRS, UMR 6293, Aubière, France

⁴ Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

Edited by:

Alberto Ferlin, University of Padova, Italy

Reviewed by:

Andrea Garolla, University of Padova, Italy

Donatella Paoli, University of Rome La Sapienza, Italy

*Correspondence:

David H. Volle, Génétique Reproduction et Développement, INSERM U 1103, CNRS, UMR 6293, Clermont Université, 24 avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France.
e-mail: david.volle@inserm.fr

In the last decades, studies in rodents have highlighted links between *in utero* and/or neonatal exposures to molecules that alter endocrine functions and the development of genital tract abnormalities, such as cryptorchidism, hypospadias, and impaired spermatogenesis. Most of these molecules, called endocrine disruptors exert estrogenic and/or antiandrogenic activities. These data led to the hypothesis of the testicular dysgenesis syndrome which postulates that these disorders are one clinical entity and are linked by epidemiological and pathophysiological relations. Furthermore, infertility has been stated as a risk factor for testicular cancer (TC). The incidence of TC has been increasing over the past decade. Most of testicular germ cell cancers develop through a pre-invasive carcinoma *in situ* from fetal germ cells (primordial germ cell or gonocyte). During their development, fetal germ cells undergo epigenetic modifications. Interestingly, several lines of evidence have shown that gene regulation through epigenetic mechanisms (DNA and histone modifications) plays an important role in normal development as well as in various diseases, including TC. Here we will review chromatin modifications which can affect testicular physiology leading to the development of TC; and highlight potential molecular pathways involved in these alterations in the context of environmental exposures.

Keywords: testicular cancer, physiology, epigenetic, endocrine disruptors

TESTICULAR CANCERS

Testicular cancer (TC) is a rare solid tumor which account for 1% of cancers in men. However, it is the most common cancer in men in their 20s and 30s (Ziglioli et al., 2011). It is a real sanitary problem as it affects men during their reproductive years. Interestingly, the development of TC has been associated with urogenital abnormalities (Olesen et al., 2007). TC development has been associated with cryptorchidism, hypospadias, and hypofertility. Indeed, epidemiological studies argue for an increased risk of testicular germ cell tumor in males who suffer for fertility troubles (Burns et al., 2010).

EPIDEMIOLOGY

In developed countries, the prognosis for TC is excellent, with a 5-year survival rate >95%. Despite it represents the most frequent solid cancer in young men, it seems a quite rare pathology (Richardson et al., 2012). Thus all these data has led to consider testicular tumors as a curable neoplasm. It has to be noted that there are some geographic and racial variation in the risk of TC development (Richiardi et al., 2004). Indeed, in US, Hispanic men had the largest increase in incidence rates for non-seminomas (Townsend et al., 2010). Next to this, the genetic predisposition has been suggested as men with familial history of germ cell TC (TGCC) have a 4- to 10-fold increased risk to develop also such tumor (Greene et al., 2010). The analysis of this genetic risk seems to be associated with an autosomal recessive mode of inheritance that must result

of the combined effects of several alleles. It was estimated that 25% of TC susceptibility account for by genetic effects (Turnbull and Rahman, 2011). If TCs are quite rare in African men, the morbidity and mortality of TC is quite high in developing countries (Ugwumba and Aghaji, 2010). These data highlight the impact of poverty and paucity of resources to detect and treat cancers. In that line, it has been reported that socioeconomic position has an impact on the risk of TC development as well as the survival rate (Richardson et al., 2012).

The main way to identify TC as soon as possible is auto-palpation by men to look at increased size or the appearance of “hard” testis (Umeh and Chadwick, 2010). After identification of the anomalies, biopsies will help to characterize the type of TC. Then imaging will also play a key role to determine the lymphatic extension and potential metastasis (Brunereau et al., 2012).

There are several kinds of TCs that need to be characterized by the physician using anatomopathological approach. There are several kinds depending on cell type at the origin of the development of TC (van de Geijn et al., 2009); thus there are intratubular germ cell neoplasia (IGCN), atypical germ cells with maturation arrest (MA), pseudolymphovascular invasion, real lymphovascular invasion in germ cell tumors, macroscopic Sertoli cell nodules, and Sertoli cell tumors. However, we can thus distinct germ cell tumors versus non-germ cell tumors. The most common TC are germ cell one which represent 95% of these tumors. There are two main types described which are seminoma and non-seminomatous

germ cell tumors, with a third one which is the spermatocytic seminoma (Mannuel et al., 2012).

Here we will focus this review on germ cell cancers. Their incidence has been reported to be continuously increasing in the last decades in men of different industrialized countries.

Regarding the two major groups of testicular germ cell cancers which are the seminomas and non-seminomas, each represent approximately 50% of germ cell tumors. It is interesting to note that around 15% of TGCC contain a mix of seminoma and non-seminomatous tumors (Aschim et al., 2006).

Seminomas are managed with orchiectomy and surveillance or radiotherapy in stage I and chemotherapy in more advanced stages (Warde et al., 2011). On the other side, non-seminomas which consist of several histologic types, such as choriocarcinoma, teratoma, yolk sac tumor, and embryonal cell carcinoma, each with different tumor marker profile, are less sensitive to radiation and are frequently treated with chemotherapy (Warde et al., 2011).

GENETIC ASSOCIATION

The development of TGCC is associated with many chromosomal abnormalities (Summersgill et al., 1998). Indeed, TGCC are aneuploid; with non-seminomatous tumors and seminoma being respectively hypotriploid and hypertriploid. The major association is with the gain of material from the chromosome arm 12p in both seminoma and non-seminomatous tumors (Atkin and Baker, 1982). The analyses of these chromosomal reorganizations lead to the characterization of potential candidates involved in the TGCC pathology. Among them, there is amplification of the KRAS and Cyclin d2 genes (Rodriguez et al., 2003). They are associated with malignant transformation and proliferation. Next to these genes, there are also those implicated in the cell pluripotency such as Stella and Nanog (Clark et al., 2004).

The strongest association for TGCC susceptibility is for single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the 12q22 within the *kit-ligand* gene (Kanetsky et al., 2009). It is correlated with a 2.5-fold increased risk of disease. This gene has been involved in several aspect of primordial germ cell (PGC) development. Indeed, it seems to act on PGC migration and survival (Gu et al., 2009). These impacts might rely on the downstream target KRAS which then activate the p110 catalytic subunit of the PI3K pathway which in turn through AKT pathways will act on proliferation, survival, and migration (Sasaki et al., 2003). KRAS could also mobilize the MAPK pathways reinforcing its impact on proliferation, survival, and migration processes.

Next to this, as testicular physiology is under the control of the endocrine functions mainly through the activity of androgen and estrogen receptors, it was deeply studied if polymorphisms of genes involved in hormonal metabolism could be associated with a higher risk of TCs. Even if some reports are contradictory, the studies focused on the androgen receptor (AR), the estrogen receptors and genes involved in either synthesis or degradation of the hormones.

Regarding the estrogen receptors, it was demonstrated that polymorphisms in ER α are associated with azoospermia (Romerius et al., 2011) and are more likely to be associated with the risk of seminoma and metastasis (Brokken et al., 2012); whereas polymorphisms in ER β are more likely to be link to altered

spermatogenesis (Aschim et al., 2005) and with risk of TGCC. New to this, polymorphisms in 17- β hydroxydehydrogenase-4 which convert androgen and estrogen to weaker hormones were associated with TGCC (Chia et al., 2010; Ferlin et al., 2010). In these metabolic pathways, polymorphisms in cytochrome P450 Cyp-1A1 gene, encoding a hormone-metabolizing protein, were identified and inversely correlated with TC. Their effects were more or less severe regarding the different polymorphisms suggesting that it may contribute to susceptibility to TGCC development (Figueroa et al., 2008; Kristiansen et al., 2011).

In this hormonal context, one of the most studied genes in regards to polymorphisms is the AR. The AR gene has two polymorphic regions in exon-1 with CAG codon encoding for glutamine and GCN which encode for glycine. Changes in the length of these polymorphic trinucleotide repeats, (CAG) and/or (GCN), lead to altered transactivation of the AR which has been shown to play a role in several forms of endocrine cancer such as prostate cancer. Regarding TC some studies are a bit contradictory showing either or not link with increased risk of TGCC (Rajpert-De Meyts et al., 2002; Garolla et al., 2005). However, it appears that the increased risk of seminoma was associated with the shorter CAG repeat length. This suggests that an increased AR transactivation may be involved in the development of seminoma and/or progression of carcinoma *in situ* (CIS) to seminoma (Davis-Dao et al., 2011). It is also demonstrated that the combination of altered number in repeat for both CAG and CGC is important for the correlation with TC. Indeed, Garolla et al. (2005) showed that the combination of CAG (20 repeats) and GGC (17 repeats) was more frequent in patient with TGCC (8 versus 1.7% in control patients).

Like most of the cancer pathologies, TCs seem to be the results of either genetic and environmental factors. It has been stated that TCs derive from a precocious lesion, the CIS of the testis, also known as IGCN or testicular intraepithelial neoplasia (TIN; Sonne et al., 2008). This lesion deserves great attention, because the diagnosis of CIS may lead to a precocious diagnosis of TCs. Usually, the diagnosis of CIS is incidental.

If there is a consensus on the fact that the process of the TC pathology may found its origin during embryonic life of the individual, it can also be suspected that there might also be some other events participating to its appearance. Indeed, it seems quite a long process that TC occurs in the 20s or 30s of life when first event took place in fetal life. Thus it could be hypothesized that there might be a second hit at puberty, like hormone burst that could provoke the definitive occurrence of TC. This clearly highlights the importance of the microenvironment. A study on patients with testicular maldescent shows that there is around a two-fold increased risk to develop TGCC if the orchidopexy is performed after the age of 13, compare to men who had the operation before their 13 (Walsh et al., 2007). Thus placing the testes in the scrotum before puberty decreases the incidence of TGCC; suggesting that intra-abdominal location at puberty promotes testicular tumorigenesis. Gene expression profiling carried out on TGCC samples demonstrate marked differences between the histological subtypes of TGCC. This reflects stages and patterns of differentiation. It also supports a model of differentiation from IGCN to seminomas or embryonal carcinomas. Gene expression patterns and

genomic imprinting analyses in TGCC show similarity to PGCs and gonocytes (Ziglioli et al., 2011).

ENVIRONMENTAL ISSUES

THE TESTICULAR DYSGENESIS SYNDROME HYPOTHESIS

In 1993, Skakkebaek and colleagues proposed that various disorders of male reproductive health, namely cryptorchidism, hypospadias, subfertility, and testicular germ cell tumor, derived from perturbations of embryonal programming and gonadal development during fetal life (Sharpe and Skakkebaek, 1993). Thus they defined it as testicular dysgenesis syndrome (TDS; Skakkebaek et al., 2001). The anomalies may lead to early symptoms, such as hypospadias and undescended testis, as well as late effects such as testis cancer and infertility. The most frequent abnormality due to TDS may be impaired spermatogenesis.

A fetal origin is obvious with regard to two symptoms of TDS: hypospadias and cryptorchidism. Moreover, studies suggested that the precursor cells of testis cancer, CIS testis, are similar to fetal gonocytes. The accepted etiology for germ cell cancer suggests that developmental arrest of fetal germ cell differentiation is a main event leading to persistence of gonocytes, which in turn develop into CIS. The causes remain unknown, although disturbances in the microenvironment provided by the Sertoli and Leydig cells may play a major role. Moreover, spermatogenesis is strictly controlled and depends on a succession of signals provided by the local environment (Skinner et al., 1991; Verhoeven, 1992; Jégou, 1993).

Among all the studies on testicular functions, there are several windows of time that must be critical for its development. Next to the importance of the fetal development, it appears that puberty must be an important timing. This is when hormone levels will reach optimal concentrations leading to the secondary sexual characters. This will also coincide with the appearance of the TGCC, as men are affected between 15 and 35 years old.

Hormones play major impacts on testicular functions throughout the life of the individuals. Indeed, testis is a key target for androgen and estrogen actions. These hormonal sensitivities have been studied for decades (Verhoeven et al., 2010). The role of testosterone is evident in patients with complete androgen insensitivity syndrome (Sultan et al., 1993).

Moreover, testicular descent occurs in two phases: the trans-abdominal phase, which animal studies suggest depends on the insulin-like hormone 3 (INSL3) produced by interstitial Leydig cells (Kaleva and Toppari, 2005; Ferlin et al., 2006, 2009). It has been demonstrated that the expression of the *Insl3* gene is under the control of the estrogen signaling pathway (Cederroth et al., 2007). Then, the inguinoscrotal phase is dependent on androgens.

Androgens play a crucial role in the control of spermatogenesis. Molecular details have been discovered using transgenic mice invalidated (knock-out, KO) for AR either in the testis or in different testicular compartments. Such mice have low testosterone levels with altered expression of steroidogenic enzymes, even Leydig cell mass is altered (Wang et al., 2009). AR is involved in autocrine action of testosterone on Leydig cells. Testosterone deficiency is responsible for spermatogenesis arrest due to altered Sertoli functions (Wang et al., 2009).

In mouse ER α have been demonstrated to be involved in the maturation of the spermatozoa (Lubahn et al., 1993). These KO mice present an excess of fluid which increases the pressure within the seminiferous tubules and leads to the germ cell loss (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997). Surprisingly, the ER β -KO mice show no testicular phenotype (Couse and Korach, 1999).

The deficient male mice for Cyp19 (Cyp19-KO), encoding for the enzyme responsible for the aromatization of testosterone into estrogens, develop normally and their genital tract is anatomically similar to that of the wild-type (Robertson et al., 1999). Males are fertile; however, some of Cyp19-KO males exhibit an altered spermatogenesis by the age of 5 months (Robertson et al., 1999). By the age of 1 year, all males develop abnormal spermatogenesis with a blockage of germ cell maturation at the spermatid stage. This is due to an increase in apoptotic rates when compared to the wild-type animals. The observation of abnormal acrosome development in the Cyp19-KO mouse suggests that acrosome biogenesis could be estrogen-dependent (Robertson et al., 1999). Interestingly, estradiol have been demonstrated to play a role as a survival factor for the human germ cells (Pentikäinen et al., 2000), and also is beneficial for sperm motility (Carreau and Hess, 2010). Moreover, next to these data, deleterious effects of numerous endocrine disruptors on sperm count and male genital tract (cryptorchidism, hypospadias, and infertility) have been documented (Iguchi et al., 2001; Sikka and Wang, 2008) particularly in the context of *in utero* and/or neonatal exposures.

Imbalanced equilibrium between the estrogen and androgen levels *in utero* is hypothesized to influence TC risk. Thus, alterations in genes involved in the action of sex hormones may contribute to variability of an individual's susceptibility to TC. Mutations in testosterone pathway genes may alter the level of testosterone *in vivo* and hypothetically the risk of developing TC (Kristiansen et al., 2012). In regard with the hypothesis of the TDS and the known impact of steroids on testicular development and functions, it has been hypothesized that endocrine-disrupting chemicals could play a role in these pathologies.

ENDOCRINE DISRUPTERS

The endocrine disrupters (EDs) are compounds which may be of industrial or natural origin and which act to dysregulate steroid function and metabolism. They produce their effects by mimicking, antagonizing, or altering endogenous steroid levels (androgens or estradiol, E2) *via* changing rates of their synthesis or metabolism and/or expression or action at receptor targets.

The question of environmental endocrine disruption has been a topic of public concern for many years and remains high on the scientific agenda. Indeed the number of chemical used is constantly increasing in developed countries, it is supposed that humans and animals can be exposed to a growing number of contaminants which can accumulate in their bodies and may have adverse consequences for health. Large range of chemicals (banned or still in use) have been characterized as EDs. Among these EDs, highly produced, Bisphenol A (BPA; Rubin, 2011) is present in plastics, including beverage and food storage containers and in the ink used for thermal paper receipts. Some individuals have also been exposed to contaminants with adverse effects originating from medical use (diethylstilbestrol, DES; Bullock et al., 1988),

or dietary habits (phytoestrogens; Naciff and Daston, 2004). More surprisingly, in China, human excretions were suspected to be the major contributor of estrogens in municipal wastewater (Zhou et al., 2012).

Moreover, studies have made correlations between elevated levels of phthalates in urines of pregnant women and lower masculinization of their progeny (Suzuki et al., 2012). EDs have also been detected in the maternal milk (Hines et al., 2009).

Regarding the urogenital development and more particularly testis, the impacts of EDs have been quite well described on human and rodent models (Volle et al., 2009; Toppari et al., 2010; Desdoits-Lethimonier et al., 2012). This is mainly true for hypospadias, cryptorchidism, and infertility; but the link with TGCC remain to be defined.

It has been demonstrated that EDs with estrogenic activity lead to a decrease of expression of steroidogenic genes which by the end result in lower testosterone concentrations (Joensen et al., 2008). However, the mechanisms seem to differ between species. This highlights the difficulties to find good experimental models. Indeed, one will claim that human cells will not react as murine cells; and other may assume that cell lines or explants tissues might not totally react as in the body. Indeed, endocrine systems are really complex and need to be analyzed in regard of the complexity of integrative physiology.

The effect of such EDs in human pathology is quite difficult to establish. It is really difficult to have standardized cohort between the studies, which is due to the history of patients (environmental and genetic factors). This heterogeneity leads to inconsistent studies which do not allow definitive conclusions on the potential involvement of EDs in TGCC.

It has been demonstrated that there was a six-fold increase in the risk of seminoma among plastic workers exposed to polyvinyl chloride (PVC; Ohlson and Hardell, 2000). However, Hardell et al. (2004a) did not found association between PVC exposure and TC.

Another study from Hardell et al. (2006) show that chlorinated biphenyls (PCBs) could play a role during fetal exposure in the etiology of TC as case mothers were identified to have significantly higher concentrations of these PCBs. However, regarding PCBs, no different risk pattern could be demonstrated for seminoma and non-seminomatous TC (Hardell et al., 2003, 2004b).

However, several studies have demonstrated some effects of these molecules on risk of TGCC (Hardell et al., 2003, 2004b, 2006; McGlynn et al., 2009). In their study McGlynn et al. (2009) associated PCBs with a decrease risk of TGCC development. Different PCBs are either associated with decrease risk of either seminoma or non-seminoma. In the same line of evidence, it was demonstrated that in patients with seminoma there was differences in concentrations of different PCBs (Purdue et al., 2009). Some PCBs (44, 49, and 52) were found to be lower accumulated in patients with seminoma compare to congeners; whereas other PCBs (99, 138, 153, 167, 183, and 195) were significantly higher accumulated in these patients. This suggest that rather than specific concentration of one or another PCB, it may be the relative concentrations of multiple one that might be relevant to established clear correlation with the risk of TC.

Moreover, evidences suggest that exposures to pesticides could be risk factor of TC development. Indeed, a recent

study reported a significant association between TC development and use of insecticides such as organochlorine pesticides, namely dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) isomer and hexachlorobenzene (Giannandrea et al., 2011).

Next to this, as TC development seems to be either associated with genetic predisposition and/or environmental exposure, it might be of interest to analyze the potential combination of such anomalies. Consistent with this hypothesis, as polymorphisms in AR and some organochlorine pesticides have been associated to risk of TGCC development, and that some of these organochlorine pesticides present anti-androgenic activities, Biggs et al. (2008) have studied the potential interaction of AR polymorphisms and exposure to p,p'-DDE and the association with TC risk. According to their study, they were not able to demonstrate any association between p,p'-DDE exposure and TC risk, either or not in combination with (CAG)_n length. However, a point to take in consideration is that p,p'-DDE concentration was measured in adult patients, but as TC is supposed to found its origin in fetal life, this must be the exposition in this period of life that must be significant to define such association. However, it will be difficult for instance to establish such correlation as we do not have access to fetal/neonatal blood of these patients. However, it could be though to perform some clinical trials to collect blood of new borns and make assay for pesticides concentrations. Then it will be necessary to follow these boys and see if they will further develop TC, and perform correlation with fetal/neonatal concentrations of pesticides.

ED and insulin-like-3

Next to their steroidogenic function, Leydig cells during development express the insulin-like-3 gene which is responsible for gubernaculum maturation (Ivell and Anand-Ivell, 2011). In human, INSL3 is produced by prenatal, neonatal, and adult Leydig cells to various extents (Ivell and Anand-Ivell, 2011). INSL3 production seems to be dependent on the state of Leydig cell differentiation, and is stimulated by the long-term trophic effects mediated by luteinizing hormone (LH; Toppari et al., 2007). This finding clearly helps in understanding the complete process of testis descent. The role of the INSL3 on testis descent was highlighted by the fact that mouse KO for the gene encoding *Insl3* results in cryptorchidism (Adham and Agoulunik, 2004). Moreover, animal model of ED exposures demonstrated that INSL3 production is sensitive to estrogenic or anti-androgenic compounds. This clearly suggests that maternal exposure to EDs during pregnancy can result in cryptorchidism, a factor that predispose to TC development.

ED and steroidogenesis

This link is of particular importance. Indeed, if CIS have been described in boys at birth (Jacobsen and Henriques, 1992), TCs appear in young men between 15 and 35 years old, suggesting that puberty and probably the increase of hormone concentrations must be key events.

The impact of EDs on steroidogenesis has been demonstrated for several decades now. EDs have been described to inhibit critical cellular functions involved in steroidogenesis, such as transport of cholesterol into the mitochondria, the expression of steroidogenic genes or the activity of these enzymes (Vanparys

et al., 2012). Indeed, it has been demonstrated that exposure of adult rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) led to lower production of testosterone in response to human chorionic gonadotropin (hCG), relative to testes from control rats (Kleeman et al., 1990). The addition of pregnenolone is able to restore normal testosterone secretion. This highlights that the impact on steroid synthesis might result from altered cholesterol synthesis or mobilization to the mitochondria (Moore et al., 1991). TCDD was also observed to reduce the number and size of the Leydig cells (Johnson et al., 1994). Moreover, the use of primary culture of Leydig cells also demonstrate that TCDD represses *Cyp11a1* expression, through the alteration of the ability of hCG to increase intracellular cAMP levels (Lai et al., 2005).

The impact on the animal phenotypes will depend on the age at exposure. Thus fetal/neonatal exposure will lead to altered internal genital organs. Indeed, experimental models have shown that disruption of the androgen signaling results in feminization of external genitalia (Nagahama et al., 2004). In animal models, exposures to low concentrations of EDs are able to alter testosterone synthesis without any effect of feminization. However, the most interesting thing is that even after neonatal exposure, the adult testosterone concentrations are decreased suggesting long-term impact that is specific to this particular window of exposure (Volle et al., 2009). This has been clearly highlighted as the exposition of adult animal lead to transitory testosterone decrease, associated with temporary germ cell death. In human, majority of the results relies on epidemiological studies and correlative data (Woodruff, 2011). However, several studies using testicular explant models have tried to characterize the impact of EDs on human Leydig cells (Desdoits-Lethimonier et al., 2012). By the end, all these data led to the idea that fetal cells must be more sensitive than adult Leydig cells.

Regarding the signaling pathways involved, and as main regulators of the expression of steroidogenic genes, a reduced activity of the cAMP-mediated PKA pathway would also be expected to reduce the mobilization of cholesterol by cholesterol hydrolases. However, at the molecular level, it has been demonstrated in mouse that neonatal exposure to EDs with estrogenic activity leads to a decrease of testosterone synthesis through ER receptors and that the orphan nuclear receptor SHP must be a key intermediary for this effect (Volle et al., 2009). Indeed, the SHP KO mice seem to be less sensitive to estrogenic EDs than their wild-type littermates. It was also demonstrated that the impact of SHP on steroidogenesis is due to the repression of either expression and/or activity of the nuclear receptors Sf-1 and Lrh-1 (Volle et al., 2009). It is to note that SHP was not involved in early post-natal decrease of testosterone production induced by estrogenic EDs. This highlights that the involved molecular pathways affected by EDs are multiple and complex.

ED and germ cell differentiation

Spermatogenesis, leading to spermatozoa formation, is a complex process with multiple steps involving mitosis, meiosis, and spermiogenesis. It takes place in the seminiferous tubules. There, germ cells are organized from the base of the tubule to the lumen. Germ cells are supported by the nursing Sertoli cells, which extend from the base to the lumen of the seminiferous tubules. Efficient

spermatogenesis also relies on the integrity of tight junctions between the Sertoli cells which form the blood–testis barrier (BTB; Cheng and Mruk, 2012). BTB has many functions in the testis such as maintaining a particular immune context and also the control of the flow of nutrients and growth factors that are required for the development of germ cells.

The key role of retinoids in the differentiation process of germ cells was highlighted by two studies demonstrating *stra8* as a key factor (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006). It also involved the timely regulation of the gene encoding for *cyp26b1*, an enzyme responsible for retinoid degradation. Indeed, CYP26B1 in Sertoli cells acts as a masculinizing factor to arrest male germ cells in the G0 phase of the cell cycle and prevents them from entering meiosis (Li et al., 2009). This induction of retinoid pathway to induced entry in meiosis seems to be inhibited by the nuclear receptor SHP, a co-repressor of the retinoid acid receptors RAR (Volle et al., 2007). In the opposite manner, the FGF9 signaling pathway acts to determine germ cell fate to enter meiosis (Boisen et al., 2001).

EPIGENETIC AND TESTICULAR CANCERS

TRANSGENERATIONAL EFFECTS: ROLE OF EPIGENETIC MODIFICATIONS

Epigenetic refers to changes of DNA information without any change of the sequences. It relies on histones post-translational modification (acetylation, methylation, ...) or of DNA methylation levels. Thus, inheritance of these information requires germline transmission of epigenetic patterns between generations. The epigenetic programming of the germline occurs during embryonic development in a sex-specific manner (Western, 2009). These processes are crucial for reproductive functions, as most of mouse models with specific germline invalidation for gene responsible of DNA or histones modifications led to sterile animals (Peters et al., 2001; La Salle et al., 2007). Regarding the male germline, it becomes imprinted following sex determination. Thus after puberty when spermatogenesis is fully functional, there are also specific epigenetic modifications along the different steps of germ cell differentiation from spermatogonial precursors up to testicular spermatozoa. Indeed, it has been demonstrated that throughout the different steps of spermatogenesis, germ cells have a dynamic of the epigenetic modifications. This is highlighted by the changes in the expression levels of the enzymes involved in these modifications. If DNA methyltransferases (Dnmts) are mainly expressed in the spermatogonia, histone methyltransferases (HMTs) are mainly expressed at the spermatocyte levels (Godmann et al., 2009). Then other histone modifications such as hyperacetylation of the H4 histone play a key role in the removal of histones and their replacement by protamines during spermatogenesis (Dhar et al., 2012). Such epigenetic modifications have also been demonstrated to be associated with infertility as for example reduced expression of *Dnmt3b* in patients with spermatogenic arrest (Adiga et al., 2011).

If the EDs cannot alter the DNA sequence, there are numerous of studies demonstrating that they can impact the epigenome. Indeed, environmental factors can alter the epigenetic programming which will impact the development of the offsprings. Interestingly, it has been demonstrated in the last decade that these effects could also potentially impact the subsequent generations

(Huang et al., 2011; Schoevers et al., 2012). Such effect was first demonstrated for the exposure with vinclozolin, a compound with anti-androgenic activities (Anway et al., 2005). Thus exposure during embryonic gonadal sex determination can alter the male germline epigenetics (e.g., DNA methylation). The epigenetic mechanism involves the alteration of DNA methylation in the germline that appears to transmit transgenerational adult onset disease, including spermatogenic defects and cancer (Anway et al., 2005). At the molecular level, the authors identify by global transcriptomic approach that the expression of genes involved in these processes such as the *Dnmt* or responsible for histone modifications was affected by vinclozolin treatment (Anway et al., 2005). All these data suggest the main involvement in transgenerational transmission.

Potential link between epigenetic and TGCT?

These modifications in epigenetic programming by EDs are of particular interest as they have been suspected to be responsible of the increased rate of pathologies related to the TDS such as TCs. This potential association between ED and epigenetic in TGCT development is highlighted by the fact that recently, number of studies have demonstrated the modified epigenetic profile of tumor cells compare to “normal” cells (Okamoto and Kawakami, 2007; Brait et al., 2012). Indeed, it appears that tumor cells show an epigenetic pattern similar to undifferentiated spermatogonial stem cells (Almstrup et al., 2010). Indeed, CIS cells have a permissive and fetal-like chromatin structure (Almstrup et al., 2010). This is consistent with the fact that CIS, precursor of TGCT have already been identified in testis of embryos.

DNA methylation. DNA methylation is an important event during germ cell development. These enzymatic modifications of DNA rely on *Dnmts*. Among them, expression profiles of DNMT3a and DNMT3l suggest that they might act during pre-natal germ cell development for the establishment of *de novo* methylation. On the other side, DNMT1 and DNMT3b rise shortly after birth in the male (Godmann et al., 2009). It was thus hypothesized that these two *Dnmts* must be involved in the maintenance of methylation patterns in proliferating spermatogonia.

The use of mouse models invalidated for genes encoding these enzymes highlights their crucial involvement during spermatogenesis. *Dnmt3a*^{-/-} males show a greatly reduced number of spermatocytes (Yaman and Grandjean, 2006; La Salle et al., 2007). This suggests a major involvement for progression through meiosis. In the same line, the males invalidated for *Dnmt3L* participate to the acquisition of DNA methylation at paternally imprinted regions, unique non-pericentric heterochromatic sequences, and interspersed repeats, including transposable elements. Moreover, *Dnmt3L*^{-/-} males present alterations of meiotic process leading to spermatogenesis arrest, and spermatocytes apoptosis (Webster et al., 2005). As *Dnmt3L* expression is restricted to gonocytes, the presence of defects in later stages suggests alteration of processes required for completion of spermatogenesis.

The major role of these epigenetic alterations has been demonstrated in carcinogenesis. Indeed, it has been shown that DNA methylation is associated with repression of tumor suppressor gene expression. This epigenetic process is one of the most studied

in the research field, and has been recognized as a major mechanism during TGCC progression (Manton et al., 2005; Ellinger et al., 2009). Moreover, the DNA methylation pattern seems to correlate with histological features of the different types of TGCC. Undifferentiated TGCC (seminomas, IGCN unclassified, and gonadoblastomas) are hypomethylated, whereas more differentiated TGCC (teratomas, yolk sac tumors, and choriocarcinomas) show a higher degree of methylation. Embryonal carcinomas show an intermediate pattern. Thus such parameters could be used to discriminate between seminoma and non-seminoma (Brait et al., 2012).

Such impact involved modifications of genes encoding for enzymes involved in DNA methylation. Consistent with cell type origin of TGCC, the *Dnmts* are mainly expressed in fetal testis and in the more undifferentiated cell type (spermatogonia) during adult normal spermatogenesis.

Regarding cancers, *Dnmt1* was not expressed in seminoma, but upregulated in embryonal carcinoma (Omisano et al., 2007). In contrast, the expression of *Dnmt3a* was found up-regulated in TGCC compared to non-tumor testicular tissues (Yamada et al., 2004). The expression pattern of *Dnmt3b* has been deeply studied and show that it could be used as a predictive marker for relapse of stage I seminomas (Arai et al., 2012). Lastly, *Dnmt3l* was overexpressed in the non-seminoma tumors (Minami et al., 2010).

These changes in *Dnmts* expression will lead to main alteration of transcriptomic profile between tumors and normal tissues (Alagaratnam et al., 2011). Among them, two targets are of particular interest as they are genes of pluripotency. Indeed, early fetal germ cells and undifferentiated germ cell tumors have in common the expression of pluripotency markers such as the transcription factors *Nanog* and *Oct3/4*. Regarding *Nanog* promoter, it was found hypomethylated in spermatogonia and hypermethylated in sperm (Nettersheim et al., 2011). This selective repression might reflect that the cells need to suppress pluripotency in order to prevent malignant transformation. Finally, methylation of CpGs in the *Nanog* promoter in germ cell tumors and derived cell lines correlated to differentiation state. In the same line, the study *Oct3/4* showed that seminoma and embryonal carcinoma were hypomethylated (De Jong et al., 2007).

Histone methylation. Many enzymes are involved in histone methylation with specific or redundant level of methylation. These differences rely on the modified histone, targeted amino-acid residues and the number of methyl groups that are added to histone. These modifications are performed by several members of the HMT family. On those involved in spermatogenesis, the Suv39h1 and suv39h2 mediate histone H3 di and/or trimethylation at lysine 9 (Schotta et al., 2003). They are involved in meiosis as double KO mice present defects in male meiosis and highly pronounced apoptosis of stage IV spermatocytes during the transition from mid to late pachytene (O’Carroll et al., 2000; Peters et al., 2001).

G9a, a mammalian HMTase, is a candidate for H3-K9 methylation in non-heterochromatic loci (Tachibana et al., 2007). G9a is essential for early embryonic development and plays a dominant role in H3-K9 methylation of euchromatin. Its role was highlighted as mice lacking G9a are sterile, with germ cells undergoing

apoptosis during the pachytene stage (Tachibana et al., 2007). Interestingly, it was demonstrated that G9a was a target of retinoid signaling pathway, a key regulator of germ cell differentiation, and that it was inhibited in the context of estrogenic exposure leading to the increased germ cell apoptosis induced by EDs (Volle et al., 2009).

Another HMT is the enhancer of zeste 2 (EZH2) which trimethylate histone H3 at the lysine 27 (Chang and Hung, 2012). It was demonstrated that during spermatogenesis, EZH2 is restricted to round spermatids in the perinuclear acrosome region (Lambrot et al., 2012). This localization is concomitant with the dramatic epigenetic reorganization that occurs during spermiogenesis leading to an extreme compaction of the chromatin.

DNA methylation, histone methylation are epigenetic modifications functioning in transcriptional control and have been implicated in the deregulation of gene expression in cancer. As mentioned above, the CIS cells present epigenetic profile similar to ES cells. Such properties of chromatin have been associated with a high transcriptional and proliferative activity. This is due to lower levels of DNA methylation and of histone methylation (H3K9me2 and H3K27me3; Almstrup et al., 2010). This is consistent with a lower expression of the gene encoding for the EZH2 in the TGCC compared to normal testis tissues (Hinz et al., 2010). This suggests that in TGCC EZH2 does not exert its often assumed oncogenic properties during malignant transformation and progression. High EZH2 levels in normal testicular tissue and the inverse association of its expression levels with the severity of spermatogenic failure point to its potential value as a molecular marker for spermatogenic defects and may indicate an important physiological role of EZH2 during intact spermatogenesis.

It has been suggested that histone H2A and H4 arginine 3 dimethylation might be a mechanism by which IGCNU and seminoma maintain the undifferentiated state; while loss of these histone modifications (Eckert et al., 2008) could be involved in the somatic differentiation observed in non-seminomatous tumors.

In healthy testis, the distribution of histone H3 methylation was dependent on the developmental stage of spermatogenic cells and in non-seminoma, histone H3-K4 and K9 methylation was detected in all histological subtypes (Lambrot and Kimmins, 2011). This suggested that histone H3-K4 and K9 methylation could be associated with abnormal gene expression in non-seminoma. Histone modifications determine epigenetic patterns of gene expression with methylation of histone H3 at lysine 4 (H3K4), and are often associated with active promoters. LSD1/KDM1 is a histone demethylase that suppresses gene expression by converting dimethylated H3K4 to mono- and unmethylated H3K4 (Wang et al., 2011). Interestingly, LSD1 protein level is highly elevated in pluripotent cancer cells and in human testicular seminoma tissues that express *Oct3/4* (Wang et al., 2011).

Histone acetylation. This is another histone modification that must also lead to gene repression. These modifications are performed by specific enzymes so-called histone deacetylase (HDCA). Such post-translation modifications are implicated in normal spermatogenesis (Fenic et al., 2008). Indeed, H3K9ac was

shown in spermatogonia, spermatocytes, elongating spermatids, and ejaculated spermatozoa of fertile and infertile men (Steilmann et al., 2011). In spermatogonia, the stainings for H3K9ac, H3K18ac, and H3K23ac were strong. Then spermatocytes, the stainings for H3K9ac, H3K18ac, H3K23ac, and H3K4me3 were reduced in the preleptotene to pachytene stage, but in diplotene stage the stainings for H3K18ac, H3K23ac, and H3K4me3 seemed to become intense in later stages (Song et al., 2011a).

The main involvement of histone acetylation during spermatogenesis is the hyperacetylation of histone H4 during spermiogenesis (Dhar et al., 2012). This signal seems to play crucial role for removal of histones and their replacement by protamines, which is key feature for nucleus condensation, and thus formation of spermatozoa. There are multiple members classified in different subfamilies. Interestingly, choriocarcinomas showed generally high expression for all three class I HDAC isoforms (Gryder et al., 2012). However in contrast with other types of tumors, no diagnostic or prognostic values for HDAC1–3 in TGCC could be inferred (Fritzsche et al., 2011).

Impact of TGCC treatment. Some testis tumors are treated using cisplatin (Koychev et al., 2011). Recent report analyzed the impact of such treatment on the integrity of spermatozoa chromatin in rats (Maselli et al., 2012). As expected, the cisplatin treatment lead to susceptibility of DNA to denaturation and the number of strand breaks were significantly increased in mature sperm. After a recovery period, it was noted that mature sperm did not show significant DNA damages. However, the protamination level of the sperm of these animals was significantly decreased. This was associated with an up-regulation of the histones H1.2, H4, H2A1, and H2B1A. This suggests long-term effect of cisplatin treatment that could have consequences for progenies even after the arrest of cancer cure.

Small non-coding RNA. Next to these well studied epigenetic processes, it also appears that microRNA and small RNA play important roles in both germ cell differentiation and transmission to subsequent generations (He et al., 2009; Suh and Blelloch, 2011; Buckley et al., 2012). Indeed, achieving the correct spatial and temporal expression of germ cell-specific genes is fundamental to the production of spermatozoa (Song et al., 2011b). Notably, for the regulation of genes involved in the repression of protein translation is central to many embryonic processes, and is particularly active during spermatogenesis.

The miRNA and siRNA are generated by the nuclear RNase III enzyme Drosha and the cytoplasmic RNase III enzyme Dicer (Papaioannou and Nef, 2010). The involvement of these particular RNA has been highlighted by the generation of mouse models invalidated for genes encoding Drosha or Dicer (Korhonen et al., 2011; Wu et al., 2012). These invalidations led to sterility due to disrupted spermatogenesis characterized by depletion of spermatocytes and spermatids leading to oligoterozoospermia or azoospermia. miRNAs mostly act by destabilizing target mRNAs or inhibiting their translation. Next to this, the PIWI-interacting RNAs (piRNAs) are predominantly expressed in the germ cell lineage (Kibanov et al., 2012). The analyses on this particular class of RNA suggest that they have a potential role in epigenetic

regulation of cell polarization. Moreover piRNA seem to be involved in silencing of transposon expression.

Many miRNA and siRNA have been implicated in the different steps of spermatogenesis. Among them, miR-449 and miR-34 seems to have common targets on the E2F signaling pathway which is mainly involved in the regulation of male germ cell development (Bao et al., 2012). Mir-17-92 (Mirc1) cluster and Mir-106b-25 (Mirc3) cluster miRNAs were suggested to cooperate in regulating spermatogonial development (Tong et al., 2012). The overexpression of miR-184 was demonstrated to promote the proliferation of a germ cell line, GC-1spg (Wu et al., 2011). It was also shown that transient inhibition of miR-21 in SSC-enriched germ cell cultures increased the number of germ cells undergoing apoptosis (Niu et al., 2011).

Interestingly, several miRNAs are unique to testis. Regarding the involvement of miR199a-5p was highlighted by the study showing an inverse relationship between miR-199a-5p and embryonal carcinoma antigen podocalyxin-like protein 1 (PODXL) expression (Cheung et al., 2011). This suggests that PODXL must be a downstream effector mediating the action of miR199a-5p. This is of particular interest as PODXL, an anti-adhesive protein, is expressed in aggressive tumors.

Next to this, miR-371-373 and miR-302 clusters are overexpressed in malignant TGCC (Novotny et al., 2012). It downregulates mRNAs involved in biologically significant pathways involved in cellular senescence induced by oncogenic stress.

Among other examples, miRNA-383 expression is downregulated in the testes of infertile men with MA (Lian et al., 2009). These results suggest that it functions as a negative regulator of proliferation, in part, through inactivation of the pRb pathway. Thus an abnormal expression of miRNA-383 may potentiate the connections between male infertility and testicular germ cell tumor.

Therapy issues. A percentage of tumors are resistant to cisplatin treatment. It seems to be associated with the high cytoplasmic expression of p21. Interestingly, it was demonstrated that there is an inverse association between cisplatin resistance and the expression of Oct4 and miR-106b (Koster et al., 2010). Thus, it was suggested that modulation of the Oct4/miR-106b/p21 pathway

could open new perspectives in the treatment of chemoresistant TC.

CONCLUSIONS/PERSPECTIVES

The increasing incidence of reproductive tract diseases and particularly TC, during the last decades, is of concern. Indeed, even if it is a well curable disease with a good 5-year survival rate, it affects men during the time of their reproductive life (between 15 and 40), suggesting that it may affect both fertility and also health of the progeny. It cannot be excluded that germ cells generated at the beginning of carcinogenesis could transmit altered DNA material, due to genetic, epigenetic perturbation. This higher rate of appearance for TC cases is supposed to be associated with exposure to environmental chemicals. This also needs to be deeply studied as in our modern society, men are exposed to an increasing amount of chemicals. This suggests that the incidence of TC could be even more important in the future decades. All these potential consequences point out the importance to study the involved mechanisms in appearance, and progression of TGCC. This means that we have to better understand the etiology for such cancers.

In long-term perspective, an increased knowledge of genetic, epigenetic, and gene expression patterns correlated with data of anatomopathology will lead to a better definition and understanding of the pathology. It also suggests that there is a need to analyze patients in a case by case approach in order to identify genetic, epigenetic alterations, and modifications of gene expression patterns. This will help to propose personalized therapy that would probably help in improving survival rate and life quality of survivors and avoid relapse.

ACKNOWLEDGMENTS

Lobaccaro's lab is supported by Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche (to Marine Baptissart), Nouveau Chercheur Auvergne (#R12087CC to David H. Volle), ANR Jeune Chercheur (#1103, to David H. Volle).

REFERENCES

- Adham, I. M., and AgoulNIK, A. I. (2004). Insulin-like 3 signalling in testicular descent. *Int. J. Androl.* 27, 257–265.
- Adiga, S. K., Ehmcke, J., Schlatt, S., Kliesch, S., Westernströer, B., Luetjens, C. M., et al. (2011). Reduced expression of DNMT3B in the germ cells of patients with bilateral spermatogenic arrest does not lead to changes in the global methylation status. *Mol. Hum. Reprod.* 17, 545–549.
- Alagaratnam, S., Lind, G. E., Kraggerud, S. M., Lothe, R. A., and Skotheim, R. I. (2011). The testicular germ cell tumour transcriptome. *Int. J. Androl.* 34(Pt 2), e133–e150.
- Almstrup, K., Nielsen, J. E., Mlynarska, O., Jansen, M. T., Jørgensen, A., Skakkebaek, N. E., et al. (2010). Carcinoma in situ testis displays permissive chromatin modifications similar to immature foetal germ cells. *Br. J. Cancer* 103, 1269–1276.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M., and Skinner, M. K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 308, 1466–1469.
- Arai, E., Nakagawa, T., Wakai-Ushijima, S., Fujimoto, H., and Kanai, Y. (2012). DNA methyltransferase 3B expression is associated with poor outcome of stage I testicular seminoma. *Histopathology* 60, E12–E18.
- Aschim, E. L., Haugen, T. B., Tretli, S., Daltveit, A. K., and Grotmol, T. (2006). Risk factors for testicular cancer – differences between pure non-seminoma and mixed seminoma/non-seminoma? *Int. J. Androl.* 29, 458–467.
- Aschim, E. L., Giwercman, A., Ståhl, O., Eberhard, J., Cwikiel, M., et al. (2005). The RsaI polymorphism in the estrogen receptor-beta gene is associated with male infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 5343–5348.
- Atkin, N. B., and Baker, M. C. (1982). Specific chromosome change, i(12p), in testicular tumours? *Lancet* 2, 1349.
- Bao, J., Li, D., Wang, L., Wu, J., Hu, Y., Wang, Z., et al. (2012). MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *J. Biol. Chem.* 287, 21686–21698.
- Biggs, M. L., Davis, M. D., Eaton, D. L., Weiss, N. S., Barr, D. B., Doody, D. R., et al. (2008). Serum organochlorine pesticide residues and risk of testicular germ cell carcinoma: a population-based case–control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17, 2012–2018.
- Boisen, K. A., Main, K. M., Rajpert-De Meyts, E., and Skakkebaek, N. E. (2001). Are male reproductive disorders a common entity? The testicular

- dysgenesis syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 948, 90–99.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., et al. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596–600.
- Brait, M., Maldonado, L., Begum, S., Loyo, M., Wehle, D., Tavora, F. F., et al. (2012). DNA methylation profiles delineate epigenetic heterogeneity in seminoma and non-seminoma. *Br. J. Cancer* 106, 414–423.
- Brokken, L. J. S., Lundberg-Giwercman, Y., De-Meyts, E. R., Eberhard, J., Ståhl, O., Cohn-Cedermark, G., et al. (2012). Association of polymorphisms in genes encoding hormone receptors ESR1, ESR2 and LHCGR with the risk and clinical features of testicular germ cell cancer. *Mol. Cell. Endocrinol.* 351, 279–285.
- Brunereau, L., Bruyère, F., Linassier, C., and Baulieu, J.-L. (2012). The role of imaging in staging and monitoring testicular cancer. *Diagn. Interv. Imaging* 93, 310–318.
- Buckley, B. A., Burkhart, K. B., Gu, S. G., Spracklin, G., Kershner, A., Fritz, H., et al. (2012). A nuclear Argonaute promotes multigenerational epigenetic inheritance and germline immortality. *Nature* 489, 447–451.
- Bullock, B. C., Newbold, R. R., and McLachlan, J. A. (1988). Lesions of testis and epididymis associated with prenatal diethylstilbestrol exposure. *Environ. Health Perspect.* 77, 29–31.
- Burns, W. R., Sabanegh, E., Dada, R., Rein, B., and Agarwal, A. (2010). Is male infertility a forerunner to cancer? *Int. Braz. J. Urol.* 36, 527–536.
- Carreau, S., and Hess, R. A. (2010). Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1517–1535.
- Cederroth, C. R., Schaad, O., Descombes, P., Chambon, P., Vassalli, J.-D., and Nef, S. (2007). Estrogen receptor alpha is a major contributor to estrogen-mediated fetal testis dysgenesis and cryptorchidism. *Endocrinology* 148, 5507–5519.
- Chang, C.-J., and Hung, M.-C. (2012). The role of EZH2 in tumour progression. *Br. J. Cancer* 106, 243–247.
- Cheng, C. Y., and Mruk, D. D. (2012). The blood–testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacol. Rev.* 64, 16–64.
- Cheung, H.-H., Davis, A. J., Lee, T.-L., Pang, A. L., Nagrani, S., Rennert, O. M., et al. (2011). Methylation of an intronic region regulates miR-199a in testicular tumor malignancy. *Oncogene* 30, 3404–3415.
- Chia, V. M., Li, Y., Quraishi, S. M., Graubard, B. I., Figueroa, J. D., Weber, J.-P., et al. (2010). Effect modification of endocrine disruptors and testicular germ cell tumour risk by hormone-metabolizing genes. *Int. J. Androl.* 33, 588–596.
- Clark, A. T., Rodriguez, R. T., Bodnar, M. S., Abeyta, M. J., Cedars, M. I., Turek, P. J., et al. (2004). Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* 22, 169–179.
- Couse, J. F., and Korach, K. S. (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20, 358–417.
- Davis-Dao, C. A., Siegmund, K. D., Vandenberg, D. J., Skinner, E. C., Coetzee, G. A., Thomas, D. C., et al. (2011). Heterogenous effect of androgen receptor CAG tract length on testicular germ cell tumor risk: shorter repeats associated with seminoma but not other histologic types. *Carcinogenesis* 32, 1238–1243.
- De Jong, J., Weeda, S., Gillis, A. J. M., Oosterhuis, J. W., and Looijenga, L. H. J. (2007). Differential methylation of the OCT3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncol. Rep.* 18, 127–132.
- Desdoits-Lethimonier, C., Albert, O., Le Bizec, B., Perdu, E., Zalko, D., Courant, F., et al. (2012). Human testis steroidogenesis is inhibited by phthalates. *Hum. Reprod.* 27, 1451–1459.
- Dhar, S., Thota, A., and Rao, M. R. S. (2012). Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 6387–6405.
- Eckert, D., Biermann, K., Nettersheim, D., Gillis, A. J. M., Steger, K., Jäck, H.-M., et al. (2008). Expression of BLIMP1/PRMT5 and concurrent histone H2A/H4 arginine 3 dimethylation in fetal germ cells, CIS/IGCNU and germ cell tumors. *BMC Dev. Biol.* 8, 106. doi: 10.1186/1471-213X-8-106
- Eddy, E. M., Washburn, T. F., Bunch, D. O., Goulding, E. H., Gladen, B. C., Lubahn, D. B., et al. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805.
- Ellinger, J., Albers, P., Perabo, F. G., Müller, S. C., von Ruecker, A., and Bastian, P. J. (2009). CpG island hypermethylation of cell-free circulating serum DNA in patients with testicular cancer. *J. Urol.* 182, 324–329.
- Fenic, I., Hossain, H. M., Sonnack, V., Tchatalbachev, S., Thierer, F., Trapp, J., et al. (2008). In vivo application of histone deacetylase inhibitor trichostatin-a impairs murine male meiosis. *J. Androl.* 29, 172–185.
- Ferlin, A., Bogatcheva, N. V., Giansello, L., Pepe, A., Vinanzi, C., Agoulnik, A. I., et al. (2006). Insulin-like factor 3 gene mutations in testicular dysgenesis syndrome: clinical and functional characterization. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 401–406.
- Ferlin, A., Ganz, F., Pengo, M., Selice, R., Frigo, A. C., and Foresta, C. (2010). Association of testicular germ cell tumor with polymorphisms in estrogen receptor and steroid metabolism genes. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 17–25.
- Ferlin, A., Zuccarello, D., Garolla, A., Selice, R., Vinanzi, C., Ganz, F., et al. (2009). Mutations in INSL3 and RXFP2 genes in cryptorchid boys. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1160, 213–214.
- Figueroa, J. D., Sakoda, L. C., Graubard, B. I., Chanock, S., Rubertone, M. V., Erickson, R. L., et al. (2008). Genetic variation in hormone metabolizing genes and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Causes Control* 19, 917–929.
- Fritzsche, F. R., Hasler, A., Bode, P. K., Adams, H., Seifert, H. H., Sulser, T., et al. (2011). Expression of histone deacetylases 1, 2 and 3 in histological subtypes of testicular germ cell tumours. *Histol. Histopathol.* 26, 1555–1561.
- Garolla, A., Ferlin, A., Vinanzi, C., Roverato, A., Sotti, G., Artibani, W., et al. (2005). Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 12, 645–655.
- Giannandrea, F., Gandini, L., Paoli, D., Turci, R., and Figà-Talamanca, I. (2011). Pesticide exposure and serum organochlorine residuals among testicular cancer patients and healthy controls. *J. Environ. Sci. Health B* 46, 780–787.
- Godmann, M., Lambrot, R., and Kimmins, S. (2009). The dynamic epigenetic program in male germ cells: its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc. Res. Tech.* 72, 603–619.
- Greene, M. H., Kratz, C. P., Mai, P. L., Mueller, C., Peters, J. A., Bratlavsky, G., et al. (2010). Familial testicular germ cell tumors in adults: 2010 summary of genetic risk factors and clinical phenotype. *Endocr. Relat. Cancer* 17, R109–R121.
- Gryder, B. E., Sodji, Q. H., and Oyelere, A. K. (2012). Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed. *Future Med. Chem.* 4, 505–524.
- Gu, Y., Runyan, C., Shoemaker, A., Surani, A., and Wylie, C. (2009). Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 136, 1295–1303.
- Hardell, L., Bavel, B., Lindström, G., Eriksson, M., and Carlberg, M. (2006). In utero exposure to persistent organic pollutants in relation to testicular cancer risk. *Int. J. Androl.* 29, 228–234.
- Hardell, L., Malmqvist, N., Ohlson, C.-G., Westberg, H., and Eriksson, M. (2004a). Testicular cancer and occupational exposure to polyvinyl chloride plastics: a case-control study. *Int. J. Cancer* 109, 425–429.
- Hardell, L., van Bavel, B., Lindström, G., Carlberg, M., Eriksson, M., Dreifaldt, A. C., et al. (2004b). Concentrations of polychlorinated biphenyls in blood and the risk for testicular cancer. *Int. J. Androl.* 27, 282–290.
- Hardell, L., van Bavel, B., Lindström, G., Carlberg, M., Dreifaldt, A. C., Wijkström, H., et al. (2003). Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ. Health Perspect.* 111, 930–934.
- He, Z., Kokkinaki, M., Pant, D., Gallicano, G. I., and Dym, M. (2009). Small RNA molecules in the regulation of spermatogenesis. *Reproduction* 137, 901–911.
- Hess, R. A., Bunick, D., Lee, K. H., Bahr, J., Taylor, J. A., Korach, K. S., and Lubahn, D. B. (1997). A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature* 390, 509–512.
- Hines, E. P., Calafat, A. M., Silva, M. J., Mendola, P., and Fenton, S. E. (2009). Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and serum of lactating North Carolina women. *Environ. Health Perspect.* 117, 86–92.
- Hinz, S., Magheli, A., Weikert, S., Schulze, W., Krause, H., Schrader, M., et al. (2010). Deregulation of EZH2 expression in human spermatogenic disorders and testicular germ cell tumors. *World J. Urol.* 28, 631–635.
- Huang, L., Huang, R., Ran, X.-R., Liu, H.-Y., Zhang, Y., Dai, L.-J., et al. (2011). Three-generation experiment showed female C57BL/6J mice drink drainage canal water containing low level of TCDD-like activity causing high pup mortality. *J. Toxicol. Sci.* 36, 713–724.
- Iguchi, T., Watanabe, H., and Katsu, Y. (2001). Developmental effects of

- estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. *Horm. Behav.* 40, 248–251.
- Ivlev, R., and Anand-Ivlev, R. (2011). Biological role and clinical significance of insulin-like peptide 3. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 210–216.
- Jacobsen, G. K., and Henriques, U. V. (1992). A fetal testis with intratubular germ cell neoplasia (ITGCN). *Mod. Pathol.* 5, 547–549.
- Jégou, B. (1993). The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 147, 25–96.
- Joensen, U. N., Jørgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., and Skakkebaek, N. E. (2008). Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 155–161.
- Johnson, L., Wilker, C. E., Safe, S. H., Scott, B., Dean, D. D., and White, P. H. (1994). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin reduces the number, size, and organelle content of Leydig cells in adult rat testes. *Toxicology* 89, 49–65.
- Kaleva, M., and Toppari, J. (2005). Cryptorchidism: an indicator of testicular dysgenesis? *Cell Tissue Res.* 322, 167–172.
- Kanetsky, P. A., Mitra, N., Vardhanabhuti, S., Li, M., Vaughn, D. J., Letrero, R., et al. (2009). Common variation in KITLG and at 5q31.3 predisposes to testicular germ cell cancer. *Nat. Genet.* 41, 811–815.
- Kibanov, M. V., Gvozdev, V. A., and Olenina, L. V. (2012). Germ granules in spermatogenesis of *Drosophila*: evidences of contribution to the piRNA silencing. *Commun. Integr. Biol.* 5, 130–133.
- Kleeman, J. M., Moore, R. W., and Peterson, R. E. (1990). Inhibition of testicular steroidogenesis in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-treated rats: evidence that the key lesion occurs prior to or during pregnenolone formation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 106, 112–125.
- Korhonen, H. M., Meikar, O., Yadav, R. P., Papaioannou, M. D., Romero, Y., Da Ros, M., et al. (2011). Dicer is required for haploid male germ cell differentiation in mice. *PLoS ONE* 6, e24821. doi: 10.1371/journal.pone.0024821
- Koster, R., di Pietro, A., Timmer-Bosscha, H., Gibcus, J. H., van den Berg, A., Suurmeijer, A. J., et al. (2010). Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. *J. Clin. Invest.* 120, 3594–3605.
- Koubova, J., Menke, D. B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M. D., and Page, D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2474–2479.
- Koychev, D., Oechsle, K., Bokemeyer, C., and Honecker, F. (2011). Treatment of patients with relapsed and/or cisplatin-refractory metastatic germ cell tumours: an update. *Int. J. Androl.* 34(Pt 2), e266–e273.
- Kristiansen, W., Aschim, E. L., Andersen, J. M., Witczak, O., Fosså, S. D., and Haugen, T. B. (2012). Variations in testosterone pathway genes and susceptibility to testicular cancer in Norwegian men. *Int. J. Androl.* doi: 10.1111/j.1365-2605.2012.01297.x [Epub ahead of print].
- Kristiansen, W., Haugen, T. B., Witczak, O., Andersen, J. M., Fosså, S. D., and Aschim, E. L. (2011). CYP11A1, CYP3A5 and CYP3A7 polymorphisms and testicular cancer susceptibility. *Int. J. Androl.* 34, 77–83.
- Lai, K. P., Wong, M. H., and Wong, C. K. C. (2005). Inhibition of CYP450scc expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. *J. Endocrinol.* 185, 519–527.
- Lambrot, R., Jones, S., Saint-Phar, S., and Kimmins, S. (2012). Specialized distribution of the histone methyltransferase ezh2 in the nuclear apical region of round spermatids and its interaction with the histone variant h1t2. *J. Androl.* 33, 1058–1066.
- Lambrot, R., and Kimmins, S. (2011). Histone methylation is a critical regulator of the abnormal expression of POU5F1 and RASSF1A in testis cancer cell lines. *Int. J. Androl.* 34, 110–123.
- La Salle, S., Oakes, C. C., Neaga, O. R., Bourc'his, D., Bestor, T. H., and Trasler, J. M. (2007). Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev. Biol.* 7, 104. doi: 10.1186/1471-213X-7-104
- Li, H., MacLean, G., Cameron, D., Clagett-Dame, M., and Petkovich, M. (2009). Cyp26b1 expression in murine Sertoli cells is required to maintain male germ cells in an undifferentiated state during embryogenesis. *PLoS ONE* 4, e7501. doi: 10.1371/journal.pone.0007501
- Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., et al. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 7, 13.
- Lubahn, D. B., Moyer, J. S., Golding, T. S., Couse, J. E., Korach, K. S., and Smithies, O. (1993). Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11162–11166.
- Mannuel, H. D., Mitikiri, N., Khan, M., and Hussain, A. (2012). Testicular germ cell tumors: biology and clinical update. *Curr. Opin. Oncol.* 24, 266–271.
- Manton, K. J., Douglas, M. L., Netzel-Arnett, S., Fitzpatrick, D. R., Nicol, D. L., Boyd, A. W., et al. (2005). Hypermethylation of the 5' CpG island of the gene encoding the serine protease testisin promotes its loss in testicular tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 92, 760–769.
- Maselli, J., Hales, B. F., Chan, P., and Robaire, B. (2012). Exposure to bleomycin, etoposide, and cisplatin alters rat sperm chromatin integrity and sperm head protein profile. *Biol. Reprod.* 86, 166, 1–10.
- McGlynn, K. A., Quraishi, S. M., Graubard, B. I., Weber, J.-P., Rubertone, M. V., and Erickson, R. L. (2009). Polychlorinated biphenyls and risk of testicular germ cell tumors. *Cancer Res.* 69, 1901–1909.
- Minami, K., Chano, T., Kawakami, T., Ushida, H., Kushima, R., Okabe, H., et al. (2010). DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 16, 2751–2759.
- Moore, R. W., Jefcoate, C. R., and Peterson, R. E. (1991). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin inhibits steroidogenesis in the rat testis by inhibiting the mobilization of cholesterol to cytochrome P450scc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109, 85–97.
- Naciff, J. M., and Daston, G. P. (2004). Toxicogenomic approach to endocrine disruptors: identification of a transcript profile characteristic of chemicals with estrogenic activity. *Toxicol. Pathol.* 32(Suppl. 2), 59–70.
- Nagahama, Y., Nakamura, M., Kitano, T., and Tokumoto, T. (2004). Sexual plasticity in fish: a possible target of endocrine disruptor action. *Environ. Sci.* 11, 73–82.
- Nettersheim, D., Biermann, K., Gillis, A. J. M., Steger, K., Looijenga, L. H. J., and Schorle, H. (2011). NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics* 6, 114–122.
- Niu, Z., Goodyear, S. M., Rao, S., Wu, X., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., et al. (2011). MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12740–12745.
- Novotny, G. W., Belling, K. C., Bramsen, J. B., Nielsen, J. E., Bork-Jensen, J., Almstrup, K., et al. (2012). MicroRNA expression profiling of carcinoma in situ cells of the testis. *Endocr. Relat. Cancer* 19, 365–379.
- O'Carroll, D., Scherthan, H., Peters, A. H., Opravil, S., Haynes, A. R., Laible, G., et al. (2000). Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Mol. Cell. Biol.* 20, 9423–9433.
- Ohlson, C. G., and Hardell, L. (2000). Testicular cancer and occupational exposures with a focus on xenoestrogens in polyvinyl chloride plastics. *Chemosphere* 40, 1277–1282.
- Okamoto, K., and Kawakami, T. (2007). Epigenetic profile of testicular germ cell tumours. *Int. J. Androl.* 30, 385–392.
- Olesen, I. A., Sonne, S. B., Hoei-Hansen, C. E., Rajpert-DeMeyts, E., and Skakkebaek, N. E. (2007). Environment, testicular dysgenesis and carcinoma in situ testis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 462–478.
- Omisano, O. A., Biermann, K., Hartmann, S., Heukamp, L. C., Sonneck, V., Hild, A., et al. (2007). DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem. Cell Biol.* 127, 175–181.
- Papaioannou, M. D., and Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *J. Androl.* 31, 26–33.
- Pentikainen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., and Dunkel, L. (2000). Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2057–2067.
- Peters, A. H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schöfer, C., Weipoltshammer, K., et al. (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.
- Purdue, M. P., Engel, L. S., Langseth, H., Needham, L. L., Andersen, A., Barr, D. B., et al. (2009). Prediagnostic serum concentrations of organochlorine compounds and risk of testicular germ cell tumors. *Environ. Health Perspect.* 117, 1514–1519.
- Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., Daugaard, G., Andersen, C. B., Petersen, P. M., Hinrichsen, J., et al. (2002). Analysis of the polymorphic CAG repeat length in the androgen receptor gene in patients with testicular germ cell cancer. *Int. J. Cancer* 102, 201–204.
- Richardson, L. C., Neri, A. J., Tai, E., and Glenn, J. D. (2012). Testicular

- cancer: a narrative review of the role of socioeconomic position from risk to survivorship. *Urol. Oncol.* 30, 95–101.
- Richiardi, L., Bellocco, R., Adami, H.-O., Torr  ng, A., Barlow, L., Hakulinen, T., et al. (2004). Testicular cancer incidence in eight northern European countries: secular and recent trends. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 2157–2166.
- Robertson, K. M., O'Donnell, L., Jones, M. E., Meachem, S. J., Boon, W. C., Fisher, C. R., et al. (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7986–7991.
- Rodriguez, S., Jafer, O., Goker, H., Summersgill, B. M., Zafarana, G., Gillis, A. J. M., et al. (2003). Expression profile of genes from 12p in testicular germ cell tumors of adolescents and adults associated with i(12p) and amplification at 12p11.2-p12.1. *Oncogene* 22, 1880–1891.
- Romerius, P., Giwercman, A., Mo  ll, C., Relander, T., Cavallin-St  hl, E., Wiebe, T., et al. (2011). Estrogen receptor α single nucleotide polymorphism modifies the risk of azoospermia in childhood cancer survivors. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 263–269.
- Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., et al. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat. Cell Biol.* 5, 427–432.
- Schoevers, E. J., Santos, R. R., Colenbrander, B., Fink-Gremmels, J., and Roelen, B. A. J. (2012). Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs. *Reprod. Toxicol.* 34, 110–119.
- Schotta, G., Ebert, A., and Reuter, G. (2003). SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica* 117, 149–158.
- Sharpe, R. M., and Skakkebaek, N. E. (1993). Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341, 1392–1395.
- Sikka, S. C., and Wang, R. (2008). Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J. Androl.* 10, 134–145.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., and Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16, 972–978.
- Skinner, M. K., Norton, J. N., Mullaney, B. P., Rosselli, M., Whaley, P. D., and Anthony, C. T. (1991). Cell–cell interactions and the regulation of testis function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 637, 354–363.
- Song, N., Liu, J., An, S., Nishino, T., Hishikawa, Y., and Koji, T. (2011a). Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem. Cytochem.* 44, 183–190.
- Song, R., Hennig, G. W., Wu, Q., Jose, C., Zheng, H., and Yan, W. (2011b). Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13159–13164.
- Sonne, S. B., Kristensen, D. M., Novotny, G. W., Olesen, I. A., Nielsen, J. E., Skakkebaek, N. E., et al. (2008). Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *Int. J. Androl.* 31, 275–287.
- Steilmann, C., Paradowska, A., Bartkuhn, M., Vieweg, M., Schuppe, H.-C., Bergmann, M., et al. (2011). Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 997–1011.
- Suh, N., and Belloch, R. (2011). Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation. *Development* 138, 1653–1661.
- Sultan, C., Lumbroso, S., Poujol, N., Belon, C., Boudon, C., and Lobaccaro, J. M. (1993). Mutations of androgen receptor gene in androgen insensitivity syndromes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 519–530.
- Summersgill, B., Goker, H., Weber-Hall, S., Huddart, R., Horwich, A., and Shipley, J. (1998). Molecular cytogenetic analysis of adult testicular germ cell tumours and identification of regions of consensus copy number change. *Br. J. Cancer* 77, 305–313.
- Suzuki, Y., Yoshinaga, J., Mizumoto, Y., Serizawa, S., and Shiraishi, H. (2012). Foetal exposure to phthalate esters and anogenital distance in male newborns. *Int. J. Androl.* 35, 236–244.
- Tachibana, M., Nozaki, M., Takeda, N., and Shinkai, Y. (2007). Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J.* 26, 3346–3359.
- Tong, M.-H., Mitchell, D. A., McGowan, S. D., Evanoff, R., and Griswold, M. D. (2012). Two miRNA clusters, Mir-17-92 (Mirc1) and Mir-106b-25 (Mirc3), are involved in the regulation of spermatogonial differentiation in mice. *Biol. Reprod.* 86, 72.
- Toppari, J., Kaleva, M., Virtanen, H. E., Main, K. M., and Skakkebaek, N. E. (2007). Luteinizing hormone in testicular descent. *Mol. Cell. Endocrinol.* 269, 34–37.
- Toppari, J., Virtanen, H. E., Main, K. M., and Skakkebaek, N. E. (2010). Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* 88, 910–919.
- Townsend, J. S., Richardson, L. C., and German, R. R. (2010). Incidence of testicular cancer in the United States, 1999–2004. *Am. J. Mens Health* 4, 353–360.
- Turnbull, C., and Rahman, N. (2011). Genome-wide association studies provide new insights into the genetic basis of testicular germ-cell tumour. *Int. J. Androl.* 34(Pt 2), e86–e96.
- Ugwumba, F. O., and Aghaji, A. E. (2010). Testicular cancer: management challenges in an African developing country. *S. Afr. Med. J.* 100, 452–455.
- Umeh, K., and Chadwick, R. (2010). Early detection of testicular cancer: revisiting the role of self-efficacy in testicular self-examination among young asymptomatic males. *J. Behav. Med.* doi: 10.1007/s10865-010-9262-z [Epub ahead of print].
- van de Geijn, G.-J. M., Hersmus, R., and Looijenga, L. H. J. (2009). Recent developments in testicular germ cell tumor research. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 87, 96–113.
- Vanparys, C., Hectors, T. L. M., Blust, R., and De Coen, W. (2012). Mechanistic profiling of the cAMP-dependent steroidogenic pathway in the H295R endocrine disrupter screening system: new endpoints for toxicity testing. *Toxicol. Lett.* 208, 174–184.
- Verhoeven, G. (1992). Local control systems within the testis. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 313–333.
- Verhoeven, G., Willems, A., Denolet, E., Swinnen, J. V., and De Gendt, K. (2010). Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1537–1556.
- Volle, D. H., Decourteix, M., Garo, E., McNeilly, J., Fenichel, P., Auwerx, J., et al. (2009). The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3752–3764.
- Volle, D. H., Duggavathi, R., Magnier, B. C., Houten, S. M., Cummins, C. L., Lobaccaro, J.-M. A., et al. (2007). The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* 21, 303–315.
- Walsh, T. J., Dall'Era, M. A., Croughan, M. S., Carroll, P. R., and Turek, P. J. (2007). Prepubertal orchiopexy for cryptorchidism may be associated with lower risk of testicular cancer. *J. Urol.* 178(Pt 1), 1440–1446.
- Wang, J., Lu, F., Ren, Q., Sun, H., Xu, Z., Lan, R., et al. (2011). Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer Res.* 71, 7238–7249.
- Wang, R.-S., Yeh, S., Tzeng, C.-R., and Chang, C. (2009). Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 30, 119–132.
- Warde, P., Huddart, R., Bolton, D., Heidenreich, A., Gilligan, T., and Fossa, S. (2011). Management of localized seminoma, stage I-II: SIU/ICUD Consensus Meeting on Germ Cell Tumors (GCT), Shanghai 2009. *Urology* 78(Suppl.), S435–S443.
- Webster, K. E., O'Bryan, M. K., Fletcher, S., Crewther, P. E., Aapola, U., Craig, J., et al. (2005). Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 4068–4073.
- Western, P. (2009). Foetal germ cells: striking the balance between pluripotency and differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 393–409.
- Woodruff, T. J. (2011). Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 108–117.
- Wu, J., Bao, J., Wang, L., Hu, Y., and Xu, C. (2011). MicroRNA-184 downregulates nuclear receptor corepressor 2 in mouse spermatogenesis. *BMC Dev. Biol.* 11, 64. doi: 10.1186/1471-213X-11-64
- Wu, Q., Song, R., Ortogero, N., Zheng, H., Evanoff, R., Small, C. L., et al. (2012). The RNase III enzyme DROSHA is essential for microRNA production and spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 25173–25190.
- Yamada, S., Kohu, K., Ishii, T., Ishidoya, S., Ishidoya, S., Hiramatsu, M., et al. (2004). Gene expression profiling identifies a set of transcripts that are up-regulated in human testicular seminoma. *DNA Res.* 11, 335–344.
- Yaman, R., and Grandjean, V. (2006). Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase 3a in testis. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 390–397.
- Zhou, Y., Zha, J., Xu, Y., Lei, B., and Wang, Z. (2012). Occurrences

of six steroid estrogens from different effluents in Beijing, China. *Environ. Monit. Assess.* 184, 1719–1729.

Ziglioli, F., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffreda, M., and Cortellini, P. (2011). Carcinoma in situ (CIS) of the testis. *Acta Biomed.* 82, 162–169.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was

conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 27 September 2012; paper pending published: 24 October 2012; accepted: 13 November 2012; published online: 29 November 2012.

Citation: Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro J-MA and Volle DH (2012) Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front. Endocrin.* 3:150. doi: 10.3389/fendo.2012.00150

This article was submitted to *Frontiers in Cancer Endocrinology*, a specialty of *Frontiers in Endocrinology*.

Copyright © 2012 Vega, Baptissart, Caira, Brugnon, Lobaccaro and Volle. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Annexe VI

Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted? (review)

Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro JMA, Volle DH,

Molecular and cellular Endocrinology, 2012



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Molecular and Cellular Endocrinology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mce

Review

Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted?

Salwan Maqdasy^{a,b,c,d,e}, Marine Baptissart^{a,b,c,d}, Aurélie Vega^{a,b,c,d}, Silvère Baron^{a,b,c,d},
Jean-Marc A. Lobaccaro^{a,b,c,d}, David H. Volle^{a,b,c,d,*}

^aINSERM, U1103, GReD, F-63171 Aubière, France^bClermont Université, Université Blaise Pascal, Génétique Reproduction et Développement, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France^cCNRS, UMR 6293, GReD, F-63177 Aubière, France^dCentre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France^eService d'endocrinologie, diabétologie, maladies métaboliques, Centre Hospitalier Universitaire et Université d'Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

ARTICLE INFO

Article history:

Available online xxx

Keywords:

Cholesterol

Male fertility

Testis

Nuclear receptors

ABSTRACT

The link between cholesterol homeostasis and male fertility has been clearly suggested in patients who suffer from hyperlipidemia and metabolic syndrome. This has been confirmed by the generation of several transgenic mouse models or in animals fed with high cholesterol diet. Next to the alteration of the endocrine signaling pathways through steroid receptors (androgen and estrogen receptors); “orphan” and “adopted” nuclear receptors, such as the Liver X Receptors (LXRs), the Proliferating Peroxisomal Activated Receptors (PPARs) or the Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1), have been involved in this cross-talk. These transcription factors show distinct expression patterns in the male genital tract, explaining the large panel of phenotypes observed in transgenic male mice and highlighting the importance of lipid homeostasis and the complexity of the molecular pathways involved. Increasing our knowledge of the roles of these nuclear receptors in male germ cell differentiation could help in proposing new approaches to either treat infertile men or define new strategies for contraception.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. Cholesterol, a major actor of testicular physiology	00
2.1. Male fertility	00
2.1.1. Pathology	00
2.1.2. Testicular histology	00
2.1.3. Hormonal regulation of testicular physiology	00
2.2. Lipid metabolism disorders and reproduction	00
2.3. “Lipidic” Nuclear Receptors in male genital tract	00
2.3.1. Steroidogenic factor 1	00
2.3.2. Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (Dax1, NR0B1)	00
2.3.3. Liver X receptors LXR α and LXR β (NR1H3 and NR1H2)	00
2.3.4. Peroxisome Proliferator Activated Receptors PPAR α , β and γ (NR1C1, NR1C2 and NR1C3)	00
2.3.5. The Liver Receptor Homolog -1 (LRH-1; NR5A2)	00
2.3.6. The Small Heterodimer Partner (SHP; NR0B2)	00
2.3.6.1. Physiological functions	00
2.3.6.2. Testicular expression pattern	00
2.3.6.3. Role in the Leydig cells	00
2.3.6.4. Potential role in germ cells	00
2.3.7. The Bile acid receptor (FXR; NR1H4)	00
2.3.7.1. Physiological functions	00
2.3.7.2. Testicular expression pattern	00

* Corresponding author at: Génétique Reproduction et Développement, Unité Mixte de Recherche CNRS 6293 Clermont Université, INSERM 1103, 24 Avenue des Landais, BP 80026, 63171 Aubière Cedex, France.

E-mail address: david.volle@inserm.fr (D.H. Volle).

0303-7207/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>

Please cite this article in press as: Maqdasy, S., et al. Cholesterol and male fertility: What about orphans and adopted? Molecular and Cellular Endocrinology (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.06.011>

2.3.7.3. Role in the Leydig cells	00
2.3.8. Retinoid X receptors	00
3. Conclusions/discussion	00
3.1. Post-testicular maturation	00
3.2. Post-ejaculation	00
3.2.1. Seminals	00
3.2.2. Prostate	00
3.3. From infertility to cancer?	00
3.4. Potential therapeutic targets?	00
Acknowledgements	00
References	00

1. Introduction

Cholesterol plays an important role in cellular function and integrity. It is essential for membrane composition, permeability, fluidity, endocytosis and intracellular signaling. Thus, its homeostasis is crucial for optimal cellular functions. The balance between its synthesis and catabolism should be strictly regulated. Deregulation of cholesterol homeostasis can be responsible for atherosclerosis and increases the risk of cardiac and/or cerebral vascular diseases (Carleton et al., 1991). Molecular mechanisms involved in lipids homeostasis have been well defined in liver and adipose tissue, two major organs implicated in the synthesis, storage and elimination of cholesterol (Goedeke and Fernandez-Hernando, 2012). Besides, male reproductive system has been demonstrated to dependent on cholesterol homeostasis. As first evidence, cholesterol is the precursor for steroid synthesis (Parton and Hancock, 2004; Simons and Ikonen, 2000; Yokoyama, 2000). Moreover, many experimental and clinical data have highlighted the

importance of lipid metabolism in the control of male fertility and more particularly testicular physiology (Wathes et al., 2007; El-Hajjaji et al., 2011).

We will review data on the impact of cholesterol homeostasis on male fertility, and the molecular mechanisms involved. Next to steroid receptors such as the androgen and estrogen receptors, here we will focus on those guided by some orphans and adopted nuclear receptors which have been defined as sensors of lipid homeostasis (Francis et al., 2003); (Repa and Mangelsdorf, 2000). Their impacts depend on their temporal and cellular localization within the testis (Fig. 1). Thus we will discuss the involvement of the Steroidogenic Factor-1 (SF-1, NR5A1), the Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (Dax1, NR0B1), the Liver X Receptors (LXR α , NR1H2/3), the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs, NR1C1/2/3), Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1, NR5A2), Small Heterodimer Partner (SHP, NR0B2), and Farnesoid X Receptor (FXR α , NR1H4).

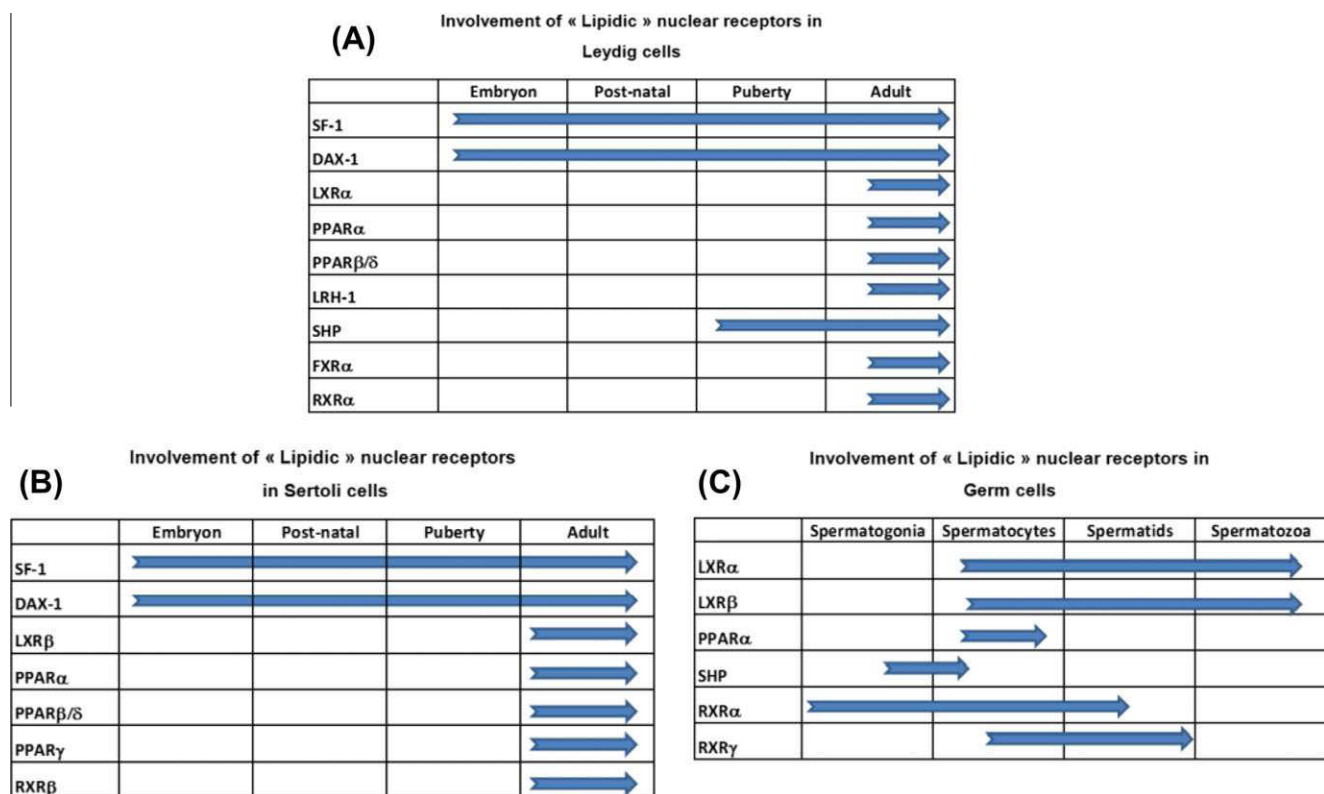


Fig. 1. Temporal or cellular localisations of «lipidic» nuclear receptors in testis. (A) In the Leydig cells; (B) in the Sertoli cells and (C) in the different stages of germ cell differentiation.

2. Cholesterol, a major actor of testicular physiology

2.1. Male fertility

2.1.1. Pathology

Secretory and excretory pathologies are responsible for male infertility. The former are due to altered spermatogenesis originating from testicular dysfunctions, whereas the latter correspond to abnormalities of male genital tract (such as epididymis) that block sperm excretion (Kolettis, 2003). In cases of infertility, Assisted Reproductive Technologies, In Vitro Fertilization (IVF) or Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), are performed depending on the alterations. Regarding ICSI, it is indicated when few motile spermatozoa are found in the sperm and sometimes testicular biopsy is needed (Schlegel and Girardi, 1997). This highlights the importance to better understand the mechanisms involved in testicular germ cell differentiation.

2.1.2. Testicular histology

The testis is composed of seminiferous tubules outlined by a basal membrane that separates them from the interstitial compartment. In adult, these two compartments respectively possess the exocrine and the endocrine functions.

2.1.2.1. Endocrine function. The interstitial space, traversed by numerous blood and lymph vessels, provides the distribution of nutrients (iron, vitamins A and E...), hormones (LH - luteinizing hormone, FSH - follicle stimulating hormone, insulin...), and growth factors (EGF - Epidermal growth factor...) necessary for spermatogenesis (Li et al., 2011a,b; Shiraishi and Matsuyama, 2012). It also contains immune cells, mainly macrophages, and the Leydig cells which produced androgens.

From a clinical point of view, testosterone is essential for reproductive function, muscle and bone mass maintenance, cognitive function and other physiological parameters (Juul and Skakkebaek, 2002; Matsumoto, 2002; Vermeulen, 2000). Testosterone deficiency results in defects in spermatogenesis, diminished libido, altered erectile function, increased risk of osteoporosis and decreased muscle mass (Bhasin et al., 2010). Recent population-based studies indicate that testosterone deficiency predicts future development of diabetes mellitus, metabolic syndrome, endothelial dysfunctions, cardiovascular events (Cunningham and Toma, 2011; Ding et al., 2006; Khaw et al., 2007; Laaksonen et al., 2004; Laughlin et al., 2008; Maggio et al., 2007).

2.1.2.1.1. Leydig cells. They constitute only 5% of somatic cells of testis (Kerr, 1991; Setchell, 2008). Physiology of the Leydig cells is under the control of the hypothalamo-pituitary LH secretion. These cells support the endocrine function of the testis through the production of androgens, mainly testosterone (Chen et al., 2009).

Steroidogenesis is a multi-step process producing steroids from cholesterol. Leydig cells can synthesize *de novo* cholesterol, and can also take cholesterol from circulating HDL (Hou et al., 1990). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a rate limiting protein in the steroidogenesis. It regulates cholesterol transport through mitochondrial membrane. Then, cholesterol side chain is cleaved by the cytochrome 450 CYP11a1 producing pregnenolone. Then several enzymatic reactions involving 3HSD and CYP17a1 allow the production of testosterone, which will then be transformed into dihydrotestosterone (DHT) by the 5 α -reductase (Hanukoglu, 1992), or into estradiol (E2) by the aromatase (Carreau et al., 2011a,b).

Androgens are involved in the maintenance of fertility and the development of secondary sexual characters (for review: (Haider, 2004)). Testosterone controls spermatogenesis through the regulation of the Sertoli cells functions (Sultan et al., 1992). Within the

latter, testosterone may act directly by stimulating the androgen receptor (Wang et al., 2009a,b), but also indirectly. Indeed, through the feedback on the hypothalamo-pituitary axis, testosterone limits the release of FSH, a key regulator of Sertoli cell functions (Ruwanpura et al., 2010).

Leydig physiology is controlled by LH, which will stimulate cAMP pathways. This results in *de novo* protein synthesis, such as StAR protein (Stocco and Sodeman, 1991), and activation of cholesterol ester hydroxylase (Stocco et al., 2005). Besides, Ca²⁺ dependent kinase system MAPK pathways are also activated (Tajima et al., 2005). Many other factors like glucocorticoids, inflammatory cytokines, estradiol, prolactin, TGF β , IGF-1, EGF, factors secreted by Sertoli cells, estradiol and testosterone itself (autocrine effect) can modulate testosterone synthesis (Dufau, 1988; Manna et al., 2006; Saez, 1994) (for intracellular Leydig signalization review: (Stocco et al., 2005)). Under acute effects of LH, free cholesterol is transferred to the inner membrane of mitochondria. Chronic stimulation leads to the expression of enzymes implicated in cholesterol transformation into testosterone (CYP11A1, 3 β HSD, CYP17 α) (Payne and Youngblood, 1995; Wang et al., 2009a,b).

The crucial role of this pathway has been highlighted by the use of transgenic mouse models and by the identification of mutations in humans. Mice lacking *Star* exhibit adrenocortical and gonadal insufficiencies due to defective steroidogenesis. They are also characterized by lipid accumulation in adrenal cortex and interstitium of testes (Caron et al., 1997). Such mutations are described in human and are associated with the same phenotypes, called lipoid congenital adrenal hyperplasia (Bose et al., 1996).

Next to its direct effects, testosterone is transformed into estrogen by cytochrome P450-19 (Cyp19), which is expressed in almost all cell types of the testis including Leydig cells (Bourguiba et al., 2003). Estrogen is a well known inhibitor of the hypothalamo-pituitary-gonadal axis (Strain et al., 1982). In obese men, probably through excess of estrogen or the increased insulin resistance, LH pulse amplitude is diminished, explaining the central origin of hypogonadism (Vermeulen, 1996; Strain et al., 1982). Many components of metabolic syndrome including dyslipidemia and diabetes mellitus are also associated with increased oxidative stress and with lipid peroxidation (Dandona et al., 2005). Increased reactive oxygen species (ROS) reduces StAR function and steroidogenesis in Leydig cells (Diemer et al., 2003). In the same context, cyclooxygenase-2 (COX 2) increase leads to inhibition of StAR expression (Wang et al., 2005a,b).

2.1.2.2. Exocrine function. Production and release of the gametes take place in the seminiferous tubules. The seminiferous epithelium contains germ cells and Sertoli cells. It is supported by a basal lamina and a wall formed of collagen fibers, fibroblasts and myoid cells. The latter possess a contractile activity involved in the propulsion of spermatozoa.

2.1.2.2.1. Sertoli cells. The number of Sertoli cells in the adult testis determines both testicular size and daily sperm production (Sharpe et al., 2003). Based on the basal lamina, Sertoli cells play a supportive role on germ cell and ensure the maintenance of spermatogenesis. Furthermore, they constitute the hemato-testicular barrier that isolates the germ cells from blood components, especially immune mediators (Fijak et al., 2011). Sertoli cells are thus the only source of nutrients and growth factors for germinal cells. Besides, they are responsible for phagocytosis of apoptotic germinal cells and seem to have a paracrine action on Leydig cells (Johnson et al., 2008).

To maintain these functions, Sertoli cells respond to two main modulators, FSH and testosterone. FSH mediates transferin and lactate production by Sertoli cells, necessary to support spermatogenesis. It also stimulates cAMP Response Element-Binding (CREB) protein phosphorylation, which mediates Sertoli cell proliferation

before puberty (Simoni et al., 1999). Mice lacking FSH receptor have a diminished fertility with underdeveloped testes (Dierich et al., 1998; Krishnamurthy et al., 2000). The same alterations are found in men with FSHR mutations (Tapanainen et al., 1997). Interestingly, mice with Sertoli cell-specific KO for androgen receptor (AR) have decreased spermatocytes and round spermatids numbers and are devoided of elongated spermatids (Denolet et al., 2006; Sharpe et al., 1994; Verhoeven, 2005). This highlights that testosterone is absolutely necessary to maintain spermatogenesis, via its actions on Sertoli cells.

Sertoli cell activities are also controlled by paracrine factors derived from the germ line. Among them, GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) and β FGF (basic fibroblast growth factor) are involved in the regulation of Cyp19 in response to FSH (Schteingart et al., 1999; Perrard and Durand, 2009).

2.1.2.2.2. Germ cells. Starting at puberty, spermatogenesis is the cyclical process by which germ cells differentiate to form sperm. The duration is 35 and 74 days in mouse and human respectively (Yoshida, 2010). In contact with the basal lamina, undifferentiated spermatogonia divide asymmetrically. Thus, they amplify by successive mitoses or differentiate into intermediate type and then type B spermatogonia. These early stages of differentiation correspond to the proliferative phase of spermatogenesis. In the second meiotic phase, spermatogonia become primary and secondary spermatocytes in which occur recombination of genetic material and chromosome segregation. Finally in the last stage of differentiation, called spermiogenesis, spermatocytes become spermatids after four major processes of maturation (Dadoune, 1994). The entire genome is condensed due to the replacement of histones by protamines (Meistrich et al., 2003), while much of the cytoplasm is eliminated after phagocytosis by the Sertoli cells (Yefimova et al., 2008). In addition, the early stages of acrosome formation and the establishment of the flagellum lead to spermatozoa (Kierszenbaum et al., 2007).

2.1.3. Hormonal regulation of testicular physiology

The testis is a key target for androgen and estrogen actions. These hormonal sensitivities have been studied for decades (Verhoeven et al., 2010). The role of testosterone is evident in patients with complete androgen insensitivity syndrome (Sultan et al., 1993).

2.1.3.1. Androgens. Spermatogenesis is strictly controlled and depends on a succession of signals provided by the local environment (Skinner, 1991; Verhoeven, 1992; Jegou, 1993). Androgens play a crucial role in the control of spermatogenesis. Molecular details have been discovered using transgenic KO mice for androgen receptor (AR) either in the testis or in different testicular compartments. Such mice have low testosterone levels with altered expression of steroidogenic enzymes, even Leydig cell mass is altered (for review: (Wang et al., 2009a,b)). AR is involved in autocrine action of testosterone on Leydig cells. Testosterone deficiency is responsible for spermatogenesis arrest due to altered Sertoli functions (Wang et al., 2009a,b).

2.1.3.2. Estrogens. First considered as female hormones, estrogens have emerged as major contributors to male genital tract since several years (Carreau et al., 2011a,b). Indeed, Cyp19 which transforms androgens into estrogens is present in almost all cell types of the testis. The estrogen receptor ER α is the major isoform expressed in Leydig cells, while ER β is expressed in Sertoli and germ cells. Recently, a G-protein-coupled receptor (GPCR; GPR30) has been described to be activated by estrogens and to be expressed in germ cells (Carreau et al., 2011a,b).

Most of the data regarding the role of estrogen in testicular physiology have been obtained from transgenic mouse models

(Couse et al., 2001), the exposition to aromatase inhibitors and estrogen-like molecules (Dunkel, 2006; Cho et al., 2003; Volle et al., 2009).

Estrogens have been described to down-regulate LH receptor and inhibit Star gene and others genes implicated in steroidogenesis (for review: (Abney, 1999)). In mouse ER α have been demonstrated to be involved in the maturation of the spermatozoa (Lubahn et al., 1993). These KO mice present an excess of fluid which increases the pressure within the seminiferous tubules and leads to the germ cell loss (Eddy et al., 1996; Hess et al., 1997). Surprisingly, the ER β -KO mice show no testicular default (Couse et al., 1997).

The deficient male mice for Cyp19 (Cyp19-KO) develop normally and their genital tract is anatomically similar to that of the wild-type. Males are fertile; however some of Cyp19-KO males exhibit an altered spermatogenesis by the age of 5 months (Robertson et al., 1999). By the age of one year, all males develop abnormal spermatogenesis with a blockage of germ cell maturation at the spermatid stage. This is due to an increase in apoptotic rates when compared to the wild-type animals. The observation of abnormal acrosome development in the Cyp19-KO mouse suggests that acrosome biogenesis could be an estrogen-dependent process (Robertson et al., 1999). Interestingly, estradiol have been demonstrated to play a role as a survival factor for the human germ cells (Pentikainen et al., 2000), and also is beneficial for sperm motility (Carreau and Hess, 2010). Moreover, next to these data, deleterious effects of numerous endocrine disruptors on sperm count and male genital tract (cryptorchidism, hypospadias and infertility) have been documented (Sikka and Wang, 2008; Iguchi et al., 2001), particularly in the context of *in utero* and/or neonatal exposures.

2.2. Lipid metabolism disorders and reproduction

Altered concentrations of plasma cholesterol can affect the reproductive function leading to infertility. This link between lipid homeostasis and fertility is clearly evident in patients who suffer from hyperlipidemia or metabolic syndrome (Kaplan et al., 2006; Kasturi et al., 2008; Padron et al., 1989). This has been confirmed by the generation of several transgenic mouse models such as the *Apolipoprotein-A1* knock-out (KO) mice or in animals fed a high cholesterol diet (Saez Lancellotti et al., 2010; Shalaby et al., 2004). Pathophysiological aspects of altered fertility associated with metabolic syndrome are complex. One main cause of infertility seems to be a defect in the hypothalamo-pituitary gonadal axis leading to a diminished LH secretion and thus a lower testosterone production. It has been associated with higher aromatization of testosterone into estrogen in the excessive adipose tissue. Furthermore, higher leptin concentrations secreted from excess adipose tissues in patients can inhibit testosterone secretion (Saad, 2009; Caprio et al., 1999; Isidori et al., 1999). Next to this, metabolic diseases are frequently associated with hyper-insulinemia which inhibits testosterone secretion through insulin receptors which are expressed on Leydig cells (Pitteloud et al., 2005). Another mechanism of hypogonadism in patients with metabolic syndrome is the decreased levels of sex hormone binding globulin (SHBG) synthesis due to insulin resistance (Plymate et al., 1988). Thus, total and free testosterone and SHBG are low in such patients (Pasquali et al., 1995). Altered fertility could also result from abnormal spermatogenesis due to increased oxidative stress in testicular microenvironment (Sheweita et al., 2005).

Moreover, lipid homeostasis is of particular importance in germ cells. These cells undergo different modifications in lipid concentrations, especially cholesterol, desmosterol and phospholipids during their differentiation. These modifications are important to maintain membrane fluidity and fertilization (Rejzaji et al., 2006).

On the other side, altered testicular functions may increase the risk of metabolic syndrome (Kupelian et al., 2006; Smith et al., 2006). Indeed, infertile patients frequently have dyslipidemia (Ramirez-Torres et al., 2000). The dramatic increase of the prevalence of metabolic syndrome in our society (Ogden et al., 2003) reinforces the importance to better understand how cholesterol homeostasis impacts on fertility and the involved molecular mechanisms.

2.3. “Lipidic” Nuclear Receptors in male genital tract

As shown in the previous part, steroid nuclear receptors (AR, ER) play major roles in male reproductive functions, and particularly testis.

Cellular regulation of cholesterol concentrations is mostly achieved by transcription factors that control the expression of genes implicated in lipid metabolism (Bantubungi et al., 2011). Over the last 20 years, some key regulators controlling the expression of genes involved in lipid homeostasis have been identified (Horton et al., 1999; Hua et al., 1995; Lehmann et al., 1997; Luo and Tall, 2000; Peet et al., 1998; Schultz et al., 1999; Streicher et al., 1996; Zeng et al., 2004). Interestingly, other members of the nuclear receptor superfamily appear to play major roles on the control of testicular physiology. Among them, we will focus here on those involved in cholesterol homeostasis. Indeed, we will focus on the nuclear receptors SF-1, Dax-1, LXR, PPAR, LRH-1, SHP, FXR and RXR (Fig. 1).

2.3.1. Steroidogenic factor 1

2.3.1.1. Physiological functions. One of the nuclear receptor that has been involved in the control of testicular physiology is the steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1). SF-1 shows high homology with the drosophila Ftz-F1 transcription factor, which controls fushi tarazu homeotic gene expression (Lavorgna et al., 1993). Interestingly, phospholipids have been demonstrated to activate SF-1 (Whitby et al., 2011). SF-1 knock-out mice die by eight days because of acute glucocorticoid and mineralocorticoid deficiency (Luo et al., 1999). During development, SF-1 is an essential regulator of genes involved in the sex determination cascade (Luo et al., 1995; Ingraham et al., 1994). The gonads of the *Sf-1*-KO mice degenerate by apoptosis just before differentiation at approximately embryonic day 10.5 (E10.5; (Luo et al., 1994)). It has been suggested that SF-1 is required for the survival and proliferation of cells in the undifferentiated gonadal primordium (Parker et al., 2002; Schimmer and White, 2010).

SF-1 has been mainly studied for its role in controlling the expression of all the steroidogenic enzymes and cholesterol transporters required for steroidogenesis. Interestingly, SF-1 regulates the hypothalamo-pituitary axis. Indeed, the pituitary-specific knock-out mice show marked hypogonadism with a decrease in male and female gonad mass and absence of sexual maturation, resulting in sterility (Ikeda et al., 1995; Zhao et al., 2001a,b).

2.3.1.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): In the mouse, *Sf-1* is expressed in the early adrenogonadal primordium from 9 day post-coitum (Ikeda et al., 1994; Val et al., 2007). In testis, SF-1 expression is maintained in the somatic cells, where it may act with SRY in supporting SOX9 expression (Sekido and Lovell-Badge, 2008).

Pezzi et al. studied the expression pattern of SF-1 in testis using primary cell cultures of Leydig, Sertoli and germ cells, isolated from adult rats, and Sertoli cells isolated from immature animals (Pezzi et al., 2004). These data show high levels of *Sf-1* mRNA in immature and mature Sertoli cells as well as in mature Leydig cells; whereas in germ cells, the *Sf-1* mRNA was present at negligible levels.

2.3.1.3. Role in Leydig cells. (Fig. 2): SF-1 has been demonstrated to be a key regulator of steroidogenic cell physiology. In these cells, SF-1 regulates all the aspects of cholesterol metabolism by controlling the expression of the scavenger receptor, class B, type I (SR-BI), the predominant receptor that supplies plasma cholesterol to steroidogenic tissues (Cao et al., 1999). It might also be involved in *de novo* synthesis of cholesterol through the regulation of the HMG-CoA synthase (Mascaro et al., 2000).

SF-1 also controls the transcription of almost all the genes encoding the steroidogenic enzymes. It also regulates the expression of *Star*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, and *P450c17* (Caron et al., 1997; Chau et al., 1997; Leers-Sucheta et al., 1997). If LH acts on steroidogenic genes through cAMP pathway, several evidences suggest that SF-1 may not be involved in response to cAMP (Hu et al., 2001).

2.3.1.4. Involvement in Sertoli cell functions. (Fig. 2): The gonad-specific *Sf-1* KO mice generated using Cre-loxP recombination with *Amhr2-Cre*, are viable with affected testes (Jeyasuria et al., 2004; Pelusi et al., 2008). The differential expression between wild-type and specific KO is clear in Sertoli cells at post-natal day 21. The germ cells were irregularly arranged with fewer Sertoli cells compared with controls, vacuoles appeared, and many of the seminiferous tubules exhibited no lumen at P14. There is also a marked reduction of PCNA-positive germ cells and a significant increase in apoptosis in KO testes. As functional maturation of the Sertoli cells is important for spermatogenesis (Sharpe et al., 2003); it is possible that abnormal development of the Sertoli cells results in the impaired spermatogenesis seen in the adult gonad-specific *Sf-1* KO testes. Indeed.

2.3.2. Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (*Dax1*, *NR0B1*)

2.3.2.1. Physiological functions. DAX1 is an unusual member of the nuclear receptor superfamily (Zanaria et al., 1994). Even though it is an orphan receptor, the C-terminal portion has the structure characteristic of a ligand-binding domain. DAX1 is a negative regulator that interacts with other nuclear receptors to inhibit their activities (McCabe, 2007). DAX1 blocks the heterodimerization between SF1 and the Wilms Tumor gene (WT1) which play a role in sexual differentiation (Vilain and McCabe, 1998).

Dax-1-KO mice show hypogonadism with reduced testis mass (Yu et al., 1998). Defective spermatogenesis leading to complete germ cell degeneration is due to germinal epithelium dysgenesis after 14 weeks of age. Testes also present a Leydig cell hyperplasia (Meeks et al., 2003), whereas Sertoli cells seem unaffected.

2.3.2.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): Dax-1 is expressed in several endocrine tissues, including the gonads. In testis, it is present in Sertoli and Leydig cells (Meeks et al., 2003).

2.3.2.3. Role in the Leydig cells. (Fig. 2): It has been shown that, in vitro, Dax-1 is able to control the expression of the genes encoding for enzymes involved in steroid synthesis. However, *in vivo*, it was demonstrated that in *Dax1*-deficient Leydig the expression levels of *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17*, *3-HSDB*, and *17β-HSD type III* mRNAs were not altered compared with wild-type (Meeks et al., 2003). In contrast, the expression of *Cyp19* mRNA was increased in *Dax1*-deficient Leydig (Wang et al., 2001a,b). The impact of this elevated estrogen pathway was reinforced by the use of the selective estrogen receptor modulator, tamoxifen, which rescues, at least in part, male fertility of Dax-1 KO males (Wang et al., 2001a,b). Moreover, in Dax-1 KO, the re-expression of Dax-1 specifically in Leydig results in improved fertility. Although testicular size was not restored, *Cyp19* expression was back to normal levels, and sperm production was increased (Meeks et al., 2003).

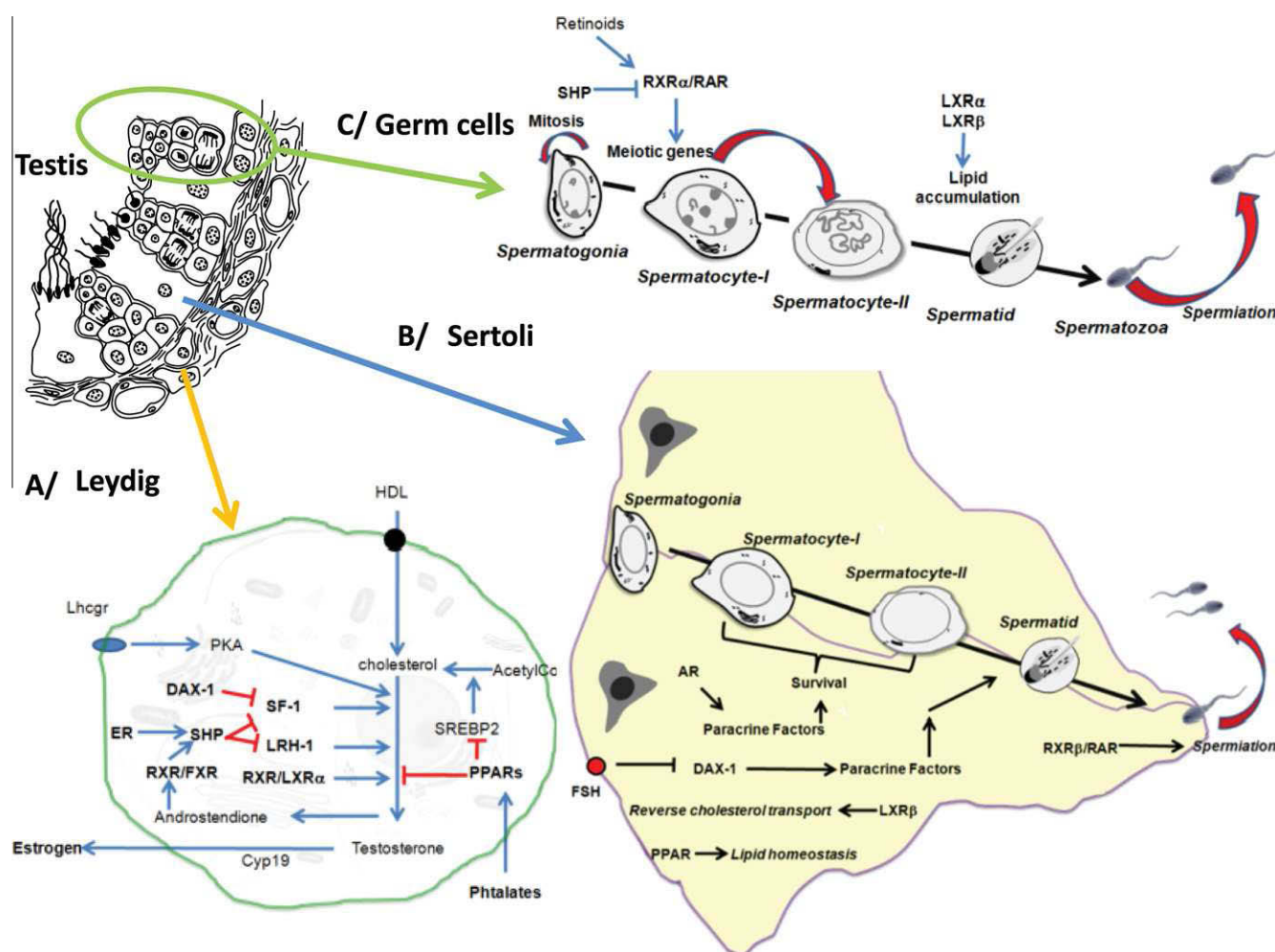


Fig. 2. Involvement of lipidic nuclear receptors in testis. (A) Main regulator of steroidogenesis is the hypothalamo-pituitary axis through LH secretion and then via PKA pathways. This LH secretion is in part regulated by LXRs. In the Leydig cells, steroids synthesis results from transformation of cholesterol originating from either endogenous production or uptake of exogenous cholesterol. Interestingly, PPARs could interfere with these pathways and mainly in the context of exposure to endocrine disruptors. Regarding the expression of steroidogenic genes, they have been demonstrated to be regulated by several nuclear receptors responding to lipidic stimulus. Positive effects were shown for SF-1, LRH-1 and LXRα. In contrast steroidogenesis is negatively controlled by PPARs, Dax-1, SHP and FXR and also by the estrogen receptors. All these data suggest that there could be some negative feedback involving several nuclear receptors such as FXR-SHP and LRH-1/SF-1. (B) Sertoli cells are supportive structure for normal spermatogenesis. This role is stimulated by testosterone and FSH. Lipid homeostasis play an important role in Sertoli cell functions as highlighted by the LXRβ or the RXRβ knock-out mice. Alteration of genes involved in the maintenance of cholesterol homeostasis led to abnormal storage of cholesterol esters which is supposed to alter Sertoli-germ cell communication. (C) Regarding germ-cells, even though both LXRs and LRH-1 have been reported to be expressed in some steps of spermatogenesis, their roles remain unknown. The role of RXRβ has been well defined in the spermiogenesis process. SHP has also been clearly involved in the decision of germ cells to enter in meiosis and progress through spermatogenesis.

2.3.2.4. Involvement in Sertoli cell functions. (Fig. 2): It was shown that the cAMP-signaling pathway induced by FSH leads to a potent down-regulation of Dax-1 expression in cultured Sertoli cells (Tami et al., 1996).

In parallel, Sertoli cell-specific expression of a *Dax-1* transgene is sufficient to partially rescue the primary testicular defect of the male *Dax-1*-KO (Jeffer et al., 2001). Fertility was completely restored. However, there is only a modest improvement in testicular morphology. The rescue of fertility may be attributed to a combination of differences in the production and functional capacity of spermatozoa (Jeffer et al., 2001).

These data suggest that following FSH effect on DAX-1, it could be involved in the regulation of genes encoding paracrine factors that will be primordial for germ cells.

2.3.3. Liver X receptors LXRα and LXRβ (NR1H3 and NR1H2)

2.3.3.1. Physiological functions. The LXRs belong to the subclass of nuclear receptors that form obligate heterodimers with the retinoid receptors RXR and are activated by oxysterols (Repa and

Mangelsdorf, 2002). The heterodimer could be activated by both ligands. LXRs have been identified as players of many physiological functions (Baranowski, 2008; Zhu et al., 2012)). Human LXRα (447 amino acids) and LXRβ (460 amino acids) share 77% sequence homology in their DBD and LBD (Lobaccaro et al., 2001).

If LXRβ is ubiquitously expressed, LXRα is mostly present in tissues with active metabolism. LXRs are involved in key functions in the control of cholesterol metabolism and lipogenesis (Zhang et al., 2012; Korach-Andre et al., 2011a,b). In the liver, these effects are mediated by LXRα. It was first demonstrated that LXR control the expression of the rate limiting step of bile acid synthesis, cytochrome 7a1 (Cyp7a1) (Peet et al., 1998). Then, they were also demonstrated to increase cholesterol reverse transport in intestine and macrophage regulating the ATP Binding Cassette genes *abca1*, *abcg5*, *abcg8* and *abcg1* (Venkateswaran et al., 2000a,b; Repa et al., 2002).

They also control carbohydrate and energy metabolism. Indeed, several studies indicate that lack of LXR expression leads to increased energy expenditure and resist to diet-induced obesity,

due to the control of uncoupling protein 1 (UCP1) expression (Korach-Andre et al., 2011a,b).

Both LXR α and LXR β have also been defined as anti-inflammatory transcription factors and physiological regulators of innate and adaptive immune responses, apoptosis and phagocytosis (Im and Osborne, 2011; Valledor, 2005).

2.3.3.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): LXRs isoforms are expressed in adult testis. If both are detected in the germ cells, LXR α is mainly expressed in Leydig cells whereas LXR β is in the Sertoli cells (Volle et al., 2007a,b). In human, the expression of several isoforms of LXR α has been described (Chen et al., 2005; Endo-Umeda et al., 2012). However, their cellular localisation has not been studied so far, nor their physiological functions.

2.3.3.3. Role in Leydig cells. (Fig. 2): LXR α is the major isoform in Leydig cells. Studies of mice KO for LXR α and LXR $\alpha\beta$ isoforms showed a clear alteration of androgen synthesis by Leydig cells. This role of LXR is not unusual as it regulates intracellular cholesterol levels (Cummins et al., 2006; Steffensen and Gustafsson, 2004), the basic fuel for steroidogenesis. Mice lacking LXR α have low intra-testicular testosterone levels (Volle et al., 2007a,b; Robertson et al., 2005). Many enzymes implicated in steroidogenesis are *bona fide* targets for LXR; we and others showed that either absence or pharmacological stimulation of LXR modulate the expression of *Star*, *3hsdB*, and *17 β hsd* and alter intra-testicular testosterone concentrations (Volle et al., 2007a,b; Lee et al., 2008). LXR α is also expressed in pituitary gland and could be responsible for the LH secretion. Indeed, LXR agonists can stimulate LH secretion (Volle et al., 2007a,b; Lee et al., 2008). Next to this, LXR also regulate the expression of *Srebp1* which enhances *Star* and *Cyp17 α* (Ozbay et al., 2006; Shea-Eaton et al., 2001).

In periphery, LXR activation induces sulfotransferase-2a1 (Sult-2a1), an enzyme responsible for androgen and estrogen deactivation (Lee et al., 2008; Gong et al., 2007). Thus, Leydig cell modulation by these receptors is partly direct and somewhat central and usually opposed by deactivation of excess testosterone by its peripheral sulfonation.

2.3.3.4. Involvement in Sertoli cell functions. (Fig. 2): LXR β has been described to be directly implicated in lipid homeostasis in Sertoli cells. LXR $\alpha\beta$ –/– and LXR β –/– mice showed excessive cholesteryl ester accumulations mainly localized in Sertoli cells. (Volle et al., 2007a,b; Robertson et al., 2005). The main genes encoding for enzymes implicated in lipid homeostasis, especially *Srebp1c*, Fatty Acid Synthase (*Fasn*), Stearoyl-CoA desaturase-1 (*Scd1*) are deregulated in testicular tissue of these mice (for review: (El-Hajjaji et al., 2011)). This lipid accumulation in Sertoli cells might participate for a destructive testicular phenotype, and explains, in part, the infertile phenotype in these mice. This seems to be linked to the regulation of ATP Binding Cassette-a1 (*abca1*), a membrane bound cholesterol export pump (Hozoji-Inada et al., 2011). Sertoli cells are the major site of testicular *ABCA1* expression. It is responsible for the efflux of excess lipids accumulating in Sertoli cells after phagocytosis of germinal cells (Kerr and de Kretser, 1974). Indeed KO mice or mutations for *abca1* lead to lipid accumulation in Sertoli cells, lower intratesticular testosterone levels and sperm counts (Selva et al., 2004). This lipid accumulation is also responsible for altered Sertoli cell functions, evaluated by the modification of FSH level (Robertson et al., 2005; Meachem et al., 2001).

2.3.3.5. Potential role in germ cells. (Fig. 2): Both LXR α and β are expressed in germinal cells. These receptors seem to be implicated in their homeostasis. We showed that mice KO for both LXRs present lipid accumulations in germ cells, especially in spermatids. These mice suffered from altered proliferation and apoptosis of germ

cells resulting in desquamation and complete disorganization of seminiferous tubules and infertility (Volle et al., 2007a,b). LXR implication in spermatogenesis could be indirect via the retinoic acid pathway, which is up regulated in these mice (Volle et al., 2007a,b).

2.3.4. Peroxisome Proliferator Activated Receptors PPAR α , β and γ (NR1C1, NR1C2 and NR1C3)

2.3.4.1. Physiological functions. There are several PPAR isoforms: PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2), and PPAR γ (NR1C3) (Auwerx, 1992). As for LXRs, PPARs form obligate permissive heterodimers with RXRs.

PPAR isoforms have specific tissue distribution which might account for their different functions. Indeed, these receptors have been identified to play a role in several key physiological functions such as in fatty acid metabolism and inflammation (Vacca et al., 2011). PPAR α is expressed in tissues with high fatty acid catabolism. In liver, PPAR α is maximally expressed during fasting and regulates lipid uptake (Blavy et al., 2009), and glucose metabolism (Jay and Ren, 2007), and detoxification (Martin et al., 2007).

PPAR δ is ubiquitously expressed. PPAR δ , generated null mice are smaller, with altered brain myelination and adipose tissue were smaller (Peters et al., 2000). However, the phenotype of these knockout animals seems to be dependent on the genetic background.

Next to these data, a protective function of PPAR δ in the heart has been proposed. Indeed, mouse model of cardiomyocyte-specific deletion of PPAR β develop a dilated cardiomyopathy due to lipotoxicity (Cheng et al., 2004).

PPAR γ is abundant in the white and brown adipose tissues, where it promotes lipid storage and adipocyte differentiation and maintenance (Tontonoz et al., 1994; Rosen et al., 1999). Furthermore, PPAR γ is involved in glucose metabolism via an improvement of insulin sensitivity (Kubota et al., 1999; He et al., 2003; Hevener et al., 2003).

2.3.4.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): Data from qPCR experiments show that all three PPARs are expressed during development in both Sertoli and germ cells (Thomas et al., 2011). In adults, PPARs are expressed in different testicular compartments, namely PPAR α in Sertoli, Leydig cells and spermatocytes, PPAR β/δ in Leydig and Sertoli cells (Schultz et al., 1999; Braissant and Wahli, 1998). Human testis contains PPAR α and β/δ , but only PPAR α is localized in Leydig cells, whereas PPAR γ is not expressed (Hase et al., 2002).

2.3.4.3. Role in Leydig cells. (Fig. 2): Exposures to PPARs activators, either pharmacological agents or endocrine disruptors decrease testosterone levels, probably due altered *de novo* synthesis of cholesterol in Leydig cells (Mimeault et al., 2005; Velasco-Santamaria et al., 2011) or due to the inhibition of mitochondrial cholesterol uptake modulated by peripheral benzodiazepine receptor protein (Gazouli et al., 2002). PPAR α agonists also by inhibit *Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* (Froment and Touraine, 2006; Li et al., 2011a,b; Corton and Lapinskas, 2005). KO mice for PPAR α or β isoforms are fertile, confirming that basal PPAR activity is not required for sexual development and fertility (Peters et al., 2000; Lee et al., 1995). However, their impact remains non negligible especially in the context of endocrine disruptors such as phthalates (Velasco-Santamaria et al., 2011; Barlow and Foster, 2003; Foster, 2006).

2.3.4.4. Involvement in Sertoli cell functions. (Fig. 2): PPAR γ could play an important role in the regulation of expression of key lipid metabolic genes in Sertoli cells, during postnatal development, as suggested by recent microarray analyses (Thomas et al., 2011).

2.3.4.5. Potential role in germ cells. (Fig. 2): PPARs are variably expressed in germ cells in different species. All three isoforms, α , β/δ and γ , are expressed in germinal cells of mice (Higashiyama et al., 2007). PPAR γ is present in human sperm. Rosiglitazone, a PPAR γ agonist enhances capacitation, acrosome reaction and motility of ejaculated human sperm (Aquila et al., 2006). Furthermore, PPARs are expressed in Sertoli and Leydig cells; this may provide an environment for germ cell maturation (Huang, 2008). All these evidences support the role of these receptors beyond lipid homeostasis.

2.3.5. The Liver Receptor Homolog -1 (LRH-1; NR5A2)

2.3.5.1. Physiological functions. LRH-1 is highly expressed in liver, pancreas and intestine (Repa and Mangelsdorf, 2000; Fayard et al., 2004). LRH-1 belongs to the NR5A subfamily as SF-1. These two receptors are closely related (Wang et al., 2005a,b). Indeed, the high degree of sequence conservation between their DNA binding domains allows them to bind to the same hexameric elements of the regulatory sequences of their direct target genes, suggesting that LRH-1 could control steroidogenesis (Fayard et al., 2004).

Even though several phospholipids have been found to bind LRH-1 in vitro (Ortlund et al., 2005), the physiological ligands remain unknown. In contrast, several co-repressors are able to efficiently repress the activity of LRH-1 by interacting with the binding domain of LRH-1, and several covalent modifications, including phosphorylation and sumoylation are known to modulate LRH-1 (Lee et al., 2006; Chalkiadaki and Talianidis, 2005; Yang et al., 2009).

LRH-1 plays key role during development for cell specification during differentiation. It also involved in the regulation of many other metabolic, immunoregulatory and proliferative function. LRH-1 is involved in reverse cholesterol transport and bile acid metabolism in the liver (Fayard et al., 2004). In the intestine, LRH-1 was shown to regulate cell renewal (Botrugno et al., 2004). LRH-1 is also a modulator of gut functions (Fernandez-Marcos et al., 2011).

LRH-1 has been shown to play key functions in ovarian physiology (Duggavathi et al., 2008), see Mouzat et al. this issue). Recently, it was also identified as a key player in the control of stem cell pluripotency (Heng et al., 2010).

2.3.5.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): During the embryonic development, LRH-1 is expressed in the gonadal primordium since E10.5. Then at E11.5, when the bipotential gonad can be differentiated from adrenal, LRH-1 is expressed in the germ cells and the surrounding somatic cells (Hinshelwood et al., 2005). In males, the expression of *LRH-1* is still detected in the germ cells and the Sertoli cells during the embryonic development up to 8-days post-natal. In the adult testis LRH-1 was found to be expressed in germ cells as well as in Leydig cells (Pezzi et al., 2004; Sierens et al., 2010; Volle et al., 2007c; Guo et al., 2007). These results obtained at different times of the development including adulthood reveal several putative roles of LRH-1 in the gonads. Indeed, the expression profiles suggest that LRH-1 could be involved in the proliferation of germ cells in the developing gonads, and also in the regulation of the steroid synthesis in both ovary and testis. Interestingly, a new *lrh-1* transcript (*mlrh-1v2*) was recently identified which is due to an alternative promoter. This transcript is expressed throughout embryogenesis and in several adult tissues, while the previously known transcript (*mlrh-1v1*) appears later during embryogenesis. Only *mlrh-1v2* was detected in ovary and testis (Gao et al., 2006).

2.3.5.3. Role in Leydig cells. (Fig. 2): LRH-1 is thought to modulate steroidogenesis. Most of steroidogenic enzymes are up regulated by LRH-1 (Mueller et al., 2006; Sirianni et al., 2002; Wang et al.,

2001a,b). It is a target for DAX-1 and SHP nuclear receptors (Volle et al., 2007c; Suzuki et al., 2003). It interacts directly with aromatase promoter up regulating its expression and promoting normal spermatogenesis (Sierens et al., 2010). *In vivo*, the LRh-1 $^{+/-}$ males show altered testicular steroidogenesis (Volle et al., 2007c).

2.3.6. The Small Heterodimer Partner (SHP; NR0B2)

2.3.6.1. Physiological functions

SHP was identified in 1996 as a member of the nuclear receptor superfamily that represses transcriptional activity of several other nuclear receptors. Like DAX-1, SHP is an atypical NR as it lacks the classical DNA-binding domain (DBD) (Seol et al., 1996).

SHP inhibits transcriptional activation of several other nuclear receptors, it can act through several mechanisms (Bavner et al., 2005). SHP interferes with the AF-2 coactivator domain of NRs for the recruitment of co-activators. It could also mediate this repression through the interaction with corepressors including direct interactions among mammalian homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* transcriptional corepressor mSin3A, SWI1/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) complexes (Kemper et al., 2004). SHP could also interact directly with NR or transcription factor, resulting in the blockade of DNA-binding and the consequent inhibition of its transcriptional activity (Bavner et al., 2005).

It is involved in fundamental biological functions and metabolic processes. One of the first mechanism in which SHP was involved is the regulation of bile acid synthesis (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). In response to bile acids, FXR induces *Shp* transcription. This leads to the inhibition of LRH-1, LXR α and HNF4 α activities on promoters of key enzymes of this pathway, *Cyp7a1* and *Cyp8b1*. Mechanisms independent of the FXR/SHP/LRH pathway might also exist, since BAs feeding to *Shp* $^{-/-}$ mice reduced the levels of CYP7A1 mRNA to similar levels of control mice. Indeed, FGF15/19 is another FXR gene target in the intestine and appears to contribute to the fine tuning of bile acid synthesis in the liver (Inagaki et al., 2005).

Furthermore, SHP appears to play a central role in obesity. SHP-deficient mice resist to high-fat-diet-induced obesity. Transgenic mice that specifically expressed SHP in adipose tissue have increased body weight and adiposity (Tabbi-Anneni et al., 2010). Energy metabolism is increased and BAT cold exposure function is enhanced with activation of thermogenic genes and mitochondrial biogenesis. Compared with wild-type mice on a high-fat diet, SHP overexpression is associated with enhanced diet-induced obesity phenotype with weight gain, increased adiposity, and severe glucose intolerance. Consistently, SHP over-expression in 3T3-L1 pre-adipocytes inhibits cell differentiation and lipid accumulation (Song et al., 2009).

Interestingly, mutations in human *Shp* gene were also associated with influence on birth weight, mild obesity, and insulin levels (Hung et al., 2003; Nishigori et al., 2001; Enya et al., 2008). *Shp* $^{-/-}$ mice are characterized by hypo-insulinemia, increased glucose dependent response of islets, increased peripheral insulin sensitivity, and increased glycogen stores (Wang et al., 2006a,b). SHP has been hypothesized to act on glucose homeostasis via complex pathways involving the inhibition of glucocorticoid receptors (GR) in mammalian cells and the inhibition of PGC-1 gene, a coactivator of NRs important for gluconeogenic gene expression and the PGC-1-regulated phospho(enol)pyruvate carboxykinase (PEPCK) promoter (Borgius et al., 2002). Following the bile acid-induced stimulation, SHP inhibits a number of other pathways, including the HNF4 α -mediated transactivation of the PEPCK and fructose biphosphate (FBP) promoters (Yamagata et al., 2004; Park et al., 2007), as well as the transactivation of the glucose-6- phosphatase (G6Pase) promoter mediated by Foxo1 (Wei et al., 2011).

2.3.6.2. Testicular expression pattern

(Fig. 1): SHP has been demonstrated to be expressed in the testis and ovary (Bookout et al., 2006; Johansson et al., 1999). Few data are available concerning the role of SHP in either testis or ovary. We have demonstrated that *Shp* is expressed during the postnatal development in the tubular compartment of the testis, either in Sertoli or germinal cells. Then around puberty and in adult testis, SHP is expressed in the interstitial cells (Volle et al., 2007c).

2.3.6.3. Role in the Leydig cells

(Fig. 2): Being important in the regulation of cholesterol homeostasis and interacting with various nuclear receptors such as FXR, LXR and PPAR, SHP is thought to have a fundamental role in steroidogenesis (Volle et al., 2007c; Brendel et al., 2002). SHP represses steroidogenesis in testes by limiting the expression of the steroidogenic enzymes, *Star*, *Cyp11a1* and *3βhsd*. This effect is mediated through SF-1 and LRH-1 (Pezzi et al., 2004; Bakke et al., 2001a,b). SHP KO mice show increased testosterone synthesis and precocious sexual maturation via derepression of SF-1 and LRH-1 (Volle et al., 2007c). These effects are independent of LH concentrations. Interestingly, testicular LXR genes are not implicated in this regulation (Volle et al., 2007c).

2.3.6.4. Potential role in germ cells

(Fig. 2): SHP regulates germ cell maturation, differentiation and transition into meiotic phase. In *Shp*–/– mice, germinal cells enter in meiosis earlier than wild-type males. This effect is indirect through regulation of retinoic acid pathways (Volle et al., 2007c). SHP-KO mice have increased intra testicular concentrations of all trans- retinoic acids. Normally, SHP down regulates retinoic acid pathway genes (*Stra-8*, *Dmc1*, *Scp3*, *Hoxa1*) by derepressing Rar. SHP-KO mice have increased accumulation of intra testicular *Stra8*, *Dmc1* and *Scp3*. Furthermore, *Cyp26b1* gene, encoding for an enzyme implicated in degradation of retinoic acid (Bowles et al., 2006), is down regulated. Indeed, RARs are also expressed in germ cells. This expression is cell specific and may vary between species (Eskild et al., 1991). They play an important role in maturation and the progression of spermatogenesis (Bowles et al., 2006). In mice, RARβ is expressed in step 7 and 8 spermatids and RARγ in spermatogonia. RARα controls spermiogenesis (Vernet et al., 2006). Mice invalidated for RARα exhibit severe degeneration of germ cells resulting in the production of seminiferous tubules devoid of epithelium (Lufkin et al., 1993), a phenotype similar to the one observed in mice with vitamin A deficiency (Ismail et al., 1990).

2.3.7. The Bile acid receptor (FXR; NR1H4)

2.3.7.1. Physiological functions

FXRα belongs to nuclear receptor superfamily which acts as an obligatory heterodimer with retinoid X receptor (RXR) (Wang et al., 1999). Identified in liver, intestine and kidney, it has been defined as bile acid receptor and preferably binds to chenodeoxycholic acid (CDCA) and its conjugated forms (Makishima et al., 1999; Wang et al., 1999). The RXR/FXR heterodimer binds to specific IR1 (inverted repeat-1) sequences on target gene promoters and then regulates their transcription. FXRα has been involved in regulation of many physiological functions (Chen et al., 2011; Hageman et al., 2010; Trauner et al., 2010).

FXR seems to be involved in regulating bile acid (BA) biosynthesis and enterohepatic cycle. Indeed, *Fxr*α–/– mice exhibit high BA plasma levels associated with abnormal hepatic biosynthesis, due to an alteration of FXRα-mediated negative feedback on BA biosynthesis (Sinal et al., 2000). In liver, FXRα represses *Cyp7a1* gene expression, a key enzyme of BA biosynthesis. At the molecular level, this pathway involves several other members of nuclear recep-

tor superfamily, such as SHP (Small heterodimer partner, NR0B2), LRH1 (Liver receptor homolog-1, NR5A2), or LXRα (Liver X Receptor α, NR1H3) (Goodwin et al., 2000; Lu et al., 2000). In hepatocytes, FXRα decreases BA uptake via repression of Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion-transporting polypeptide (OATP) -1 and OATP4 expressions (Denson et al., 2001; Maeda et al., 2004). It also promotes BA excretion in bile ducts through transcriptional induction of the specific BA transporter BSEP (Bile salt export pump) in hepatocytes (Ananthanarayanan et al., 2001). FXRα is also involved in controlling lipid and glucose homeostasis as suggested by high plasma triglycerides concentrations in *Fxr*α–/– mice (Lefebvre et al., 2009; Sinal et al., 2000) via a SHP-dependant pathway, FXRα limits triglyceride synthesis. Indeed, it inhibits the expression of enzymes involved in triglyceride synthesis such as *Srebp1c*, *Fasn* and *Scd-1* (Watanabe et al., 2004). In parallel, FXRα controls blood glucose by lowering expression of *Pepck* and *G6Pase* (Renga et al., 2012). FXR also regulates *Fgf15/19* in the intestine which contributes to the fine tuning of bile acid synthesis in the liver (Inagaki et al., 2005).

2.3.7.2. Testicular expression pattern

(Fig. 1): Like SHP, very few data are available regarding the expression of *Fxr* in the genital tract. Northern blot analyses have demonstrated that *Fxr* is expressed in both ovary and testis (Repa and Mangelsdorf, 2000). Furthermore, we showed that *Fxr* is expressed in the interstitial cells of the adult testis (Volle et al., 2007c).

2.3.7.3. Role in the Leydig cells

(Fig. 2): *Fxr*α is expressed in the interstitium of testis (Volle et al., 2007c). Mice treated with FXR pharmacological agonist show induced *shp* mRNA expression. Interestingly, *Fxr*-KO mice have normal testosterone concentrations, *Shp* and steroidogenic enzymes mRNA levels (Volle et al., 2007c). FXR has been demonstrated to regulate steroidogenesis down regulation of the aromatase activity in Leydig cells (Swales et al., 2006; Catalano et al., 2010), modulation of *Sult2a1*, *3βhsd* and *5α-reductase*, enzymes involved in steroid synthesis, activation and deactivation of testosterone (Catalano et al., 2010; Miyata et al., 2006). Note thus, androsterone, a metabolic product of testosterone, is able to activate FXR (Wang et al., 2006a,b). This could give a nice negative feedback of the androgen synthesis where androgen metabolites could inhibit their own production through a FXR/SHP/SF1-LRH1 pathway, as in the liver.

2.3.8. Retinoid X receptors

2.3.8.1. Physiological functions. Retinoid X receptors (RXRα, β and γ) heterodimerize with numerous nuclear receptors, which include retinoic acid receptors (RARs), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and liver oxysterol receptors (LXRs), and display a ligand-dependent transcriptional activity that requires the integrity of the activation function 2 (AF-2) core, contained within α-helix 12 (Chambon, 1996). In nonpermissive heterodimers, RXRs are transcriptionally inactive, unless their partners are liganded, whereas in permissive heterodimers RXRs can be transcriptionally active, irrespective of the presence of their partner's ligand (Vivat et al., 1997). Thus, permissive heterodimerization may integrate two hormonal pathways within a single functional unit. Genetic evidence indicates that the highly pleiotropic developmental effects of retinoic acid are mediated by nonpermissive RXRα/RARα, β and γ heterodimers, in which the AF-2 of RXRα may either be dispensable or required (Mascres et al., 1998; Matt et al., 2003).

Regarding cholesterol homeostasis, RXR isoforms play an important role as they form heterodimers with key “lipidic” nuclear receptors such as LXR, PPAR and FXR as discussed above.

2.3.8.2. Testicular expression pattern. (Fig. 1): Regarding Leydig cells, RXR α and β are the major isoforms in fetal life and RXR α and β in adulthood (Boulogne et al., 1999). In contrast, RXR β is the main isoform expressed in Sertoli cells. RXR α and γ are thought to be the major isoforms of RXR expressed in germinal cells. RXR α is expressed in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids, while RXR γ isoform is mainly found in pachytene spermatocytes and elongated spermatids (Dufour and Kim, 1999).

2.3.8.3. Role in Leydig cells. (Fig. 2): LXRs, FXR α and PPARs, as many other nuclear receptors, form heterodimers with RXR α . Retinoids may have a double effect; being antioxidant, retinoic acid at physiological concentrations increases Leydig cell viability, promotes its proliferation and blocks the negative effect of oxidative stress on steroidogenesis (Hales et al., 2005; Perri et al., 2010). In adult Leydig cells, retinoids increase the basal testosterone secretion and expression of *StAR* and *P450c17* and decrease *3hsdB* and *Lhr* synthesis (Chaudhary et al., 1989; Lefevre et al., 1994). Vitamin A deficiency is known to be associated with impaired testosterone secretion (Appling and Chytil, 1981). Inversely, excess of retinoids has negative effects on mass and function of Leydig cells. Animal and cellular studies showed that high doses of retinoid reduce generally the number of somatic (Sertoli and Leydig) cells (Boulogne et al., 1999), induce apoptosis of Leydig cells, probably due to lipid peroxidation (Tucci et al., 2008) and may play a negative role on steroidogenesis during fetal and adulthood life (Livera et al., 2004). Thus, nuclear receptors for retinoids are directly involved in regulation of Leydig cell function and may either promote or block retinoid effect on testes during their mild deficiency or excess.

2.3.8.4. Involvement in Sertoli cell functions. (Fig. 2): RXR β is the major isoform expressed in Sertoli cells and it plays a key role in lipid homeostasis in these cells. Indeed, KO mice for RXR β are infertile with a defect in spermiation, enlightening the importance of retinoic acids for this step; they show a progressive lipid accumulation in Sertoli cell cytoplasm (Kastner et al., 1996; Mascres et al., 2004).

The dialogue between retinoic pathway and LXR is well established, LXR deficient mice show an up regulation of gene involved in retinoic pathways (Volle et al., 2007a,b). This could participate in the testicular degeneration, be responsible for lipid accumulation in Sertoli cells (Biswas and Deb, 1965) and may induce defects in synchronization of spermiation. All these factors participate in the phenotype of infertility in these mice (for review: (Livera et al., 2002)).

Specific inactivation of RXR β in Sertoli cells leads to the failure of spermatid release, accumulation of cholesterol esters and, subsequently, testis degeneration (Vernet et al., 2008).

2.3.8.5. Potential role in germ cells. (Fig. 2): RXRs are also implicated in germ cell differentiation and maturation. RXR α and γ are thought to be the major isoforms of RXR expressed in germinal cells. RXR α is expressed in spermatogonia, spermatocytes and round spermatids, while RXR γ isoform is mainly found in pachytene spermatocytes and elongated spermatids (Dufour and Kim, 1999). These isoforms are mainly described to dimerize with other nuclear receptors in germ cells, especially RAR α . Thus it is not unexpected that animals with RXR α or γ mutation be infertile, at least because of RAR α signaling dysfunction in these animals. Nevertheless, RXR β null mice are infertile due to oligo-astheno-teratozoospermia and because of failure of spermatid release. With aging, these mice demonstrate complete germ cell degeneration (Kastner et al., 1996).

3. Conclusions/discussion

The development of intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) is an important recent breakthrough in the treatment of male infertility, but it does not treat the cause. Indeed, male fertility seems to have declined over the last decades (Skakkebaek et al., 2006). If testicular physiology has been considered for long for endocrine issues, the increasing incidence of disorders might be linked with environmental and/or compartmental features. Beside the classical steroid hormone receptors (AR, ER), reverse endocrinology pointed out, in male fertility, the determinant role of the “orphan-adopted” nuclear receptors, such as those controlling lipid homeostasis. Indeed, cholesterol plays an important role in maintenance of reproductive functions and can be responsible of fertility disorders.

As reviewed here, several nuclear receptors, adopted or orphans, have been demonstrated to be key regulators of the testis physiology. They act throughout the development from embryo to adulthood. They clearly appear to control all the aspects of lipid metabolism from synthesis, storage and catabolism. In the future, these receptors may help to better understand, at the molecular level, the association between Metabolic Syndrome and infertility.

Here, we focus on testicular physiology; however, fertility requires combined activities of several organs. Indeed, even though the testis is the key organ for the production of the spermatozoa, these testicular spermatozoa are not functional. They will need further maturation during transit into epididymis. Then after ejaculation, spermatozoa also need to be protected. For that purpose, the composition (proteins and minerals) of the semen will be of major importance to nourish, transport and to protect spermatozoa (Gonzales, 2001). Thus its proper and successful functioning is a key factor in male fertility.

3.1. Post-testicular maturation

The epididymis plays an important role in their maturation. Indeed, spermatozoa leaving testes are neither mobile nor fertile; they are submitted to different modifications in the epididymis and female genital tract to be fertile (Yanagimachi, 1994). Sperm maturation in the epididymis includes morphological modifications affecting protein and lipid composition (Rejraji et al., 2006). These modifications render spermatozoa mobile.

Cholesterol is found in spermatid membrane. Cholesterol to phospholipid ratio affects membrane fluidity and determines spermatid mobility, capacitation and acrosomal reaction (Motamed Khorasani et al., 2000). During their maturation, spermatozoa lose cholesterol in favor of desmosterol and undergo different modifications in concentrations of different phospholipids to promote membrane fluidity (Haidl and Oppen, 1997; Jones, 1998; Travis and Kopf, 2002).

A study of sterols and phospholipid repartition in spermatozoa and seminal fluid in hypercholesterolemic patients did not show any modification compared to normocholesterolemic patients (Grizard et al., 1995). Other studies showed that a statin treatment, changing plasma cholesterol levels, does not affect sperm quality, or slightly alter sperm mobility (Farnsworth et al., 1987; Niederberger, 2005; Purvis and Christiansen, 1992).

Cholesterol homeostasis in epididymal microenvironment is not well understood. Few studies have been performed on the control of this process and on its effects on sperm maturity. ABC proteins are expressed on spermatozoa membrane (Morales et al., 2008). They may be responsible for cholesterol efflux from spermatozoa, which will be liberated to apolipoproteins secreted from epididymis and implicated in sperm maturation (Law et al., 1997).

LXRs are implicated in lipid homeostasis in different organs (Volle and Lobaccaro, 2007a), LXR α and β are expressed in caput and cauda epididymides, LXR β being the highest (Frenoux et al., 2004). LXR $^{-/-}$ mice are characterized by the loss of epithelial height due to epithelial cell apoptosis and lipid accumulation in peritubular and interstitial compartments of first and second parts of epididymis caput. Gametes obtained from the tail of epididymis of these mice are fragile (Frenoux et al., 2004; Saez et al., 2007). Further evaluation demonstrated cholesteryl ester accumulation due to down regulation of cholesterol trafficking protein (ABCA1) in caput epididymides which is segmental specific (Ouvrier et al., 2009).

3.2. Post-ejaculation

Coagulation occurs immediately after ejaculation. This step is important to allow all spermatozoa to be in contact with the nutrients in the semen. It promotes sperm motility, increase stability of sperm chromatin, and suppress the immune activity in the female reproductive tract to avoid rejection of spermatozoa (Gonzales, 2001). Secretion of the seminal vesicles and prostate constitutes the majority of the ejaculates.

3.2.1. Seminals

This organ is mainly under the control of androgens (Fujii, 1977) as proved by its regression during castration experiments. So far independently of hormonal alteration, the potential role of the other “lipidic” nuclear receptor discussed above have not been studied. The measurement of seminal fructose is used as a marker of the seminal vesicle function (Gonzales and Villena, 2001).

3.2.2. Prostate

The prostate works in conjunction with the seminal vesicles and Cowper's glands which also participate to sperm production.

Prostate secretions have huge impact on fertility as they are involved at many levels. Zinc in prostate fluid can kill bacteria, in order to protect the prostate gland and the whole genito-urinary system (Cowan et al., 1991). There is also some nutritive material for sperm. Prostate fluid can neutralize the acid in vagina to ensure the survival of sperm. At least, protease and fibrinolytic enzyme in the prostate fluid can help the sperm to get through the mucus at cervix of womb and ZP zona pellucida of the egg, so that the egg can be fertilized (Espana et al., 2007; Quinn and Begley, 1984).

Many studies have associated the potential impact of PPAR, FXR or LXR in the context of the tumor processes, modulating proliferation, apoptosis or migration (Kim et al., 2009; Pommier et al., 2010; Jiang et al., 2011; Kaeding et al., 2008). In the context of this review on the link between secretion and fertility one recent article could be of interest. Indeed Viennois et al. demonstrate that in Lxr α $^{-/-}$ secretion process was altered (Viennois et al., 2012). These mice develop ventral prostate hypertrophy, correlating with an overaccumulation of secreted proteins in prostatic ducts and an alteration of vesicular trafficking in epithelial cells. In the fluid of the Lxr α $^{-/-}$ prostates, spermine binding protein is highly accumulated. These data point out the crucial role of Lxr α in the homeostasis of the ventral prostate. It is not excluded that such alteration of prostate secretion could have an impact on sperm quality.

3.3. From infertility to cancer?

There are evidences that infertility may predispose to the development of testicular cancer (Hotaling and Walsh, 2009). Men seeking infertility treatment had an increased risk of developing testicular cancer (Walsh et al., 2009). Testicular cancer is the most common malignancy in 20- to 34-years-old males (Ziglioli et al.,

2011). It has been stated that testicular cancer derives from a precocious lesion, the carcinoma in situ of the testis, also known as Intratubular Germ Cell Neoplasia (IGCN) or Testicular Intraepithelial Neoplasia (TIN) (Ziglioli et al., 2011). It is hypothesized that the molecular and genetic alterations responsible for this pathology could take place during embryonic development. This is the basis of the Testicular Dysgenesis Syndrome, which sustains the potential involvement of endocrine disrupters in such pathology (Skakkebaek et al., 2001).

Interestingly, dietary patterns play a role on cancer development such as prostate tumors (Sebastiano et al., 2012). Indeed, some epidemiological and animal studies have reported a relation between the increase of fat intake and incidence of cancers. For example, some studies have proved that effects on these cancers are greatly different by the type of fatty acids contained in the fatty diet rather than the quantity of the fat intake itself (Swinen et al., 2006).

Regarding the emerging role of lipid metabolism in the development and the progression of tumors (Brusselmans et al., 2007), these “lipidic” nuclear receptors could be of interest in the context of testicular cancer. So far, few data are available on a potential role of these nuclear receptors in the etiology of this pathology. However, it was recently described that PPAR γ is highly expressed in human testicular cancers compared to normal tissues (Hase et al., 2002).

3.4. Potential therapeutic targets?

Thus, a new field of investigations is now open which suggests several questions to be answered. Indeed, are there, in human infertility, some mutations of these NRs or deregulated pathways activated by the NRs? Could these transcription factors be used as therapeutical targets? Such ideas have been reported by many authors for almost all the orphans reviewed here, and this in many different diseases (Viennois et al., 2011; Decourteix and Volle, 2010). The challenge will be to develop strategies that will allow targeting some of these receptors at specific timing and specific cellular localization. The road will be long before using any synthetic agonist to treat human infertility, but the gate is open. ...

Acknowledgements

Lobaccaro's lab is supported by FRM and Fondation BNP-Paribas, Association de Recherche sur les Tumeurs Prostatiques, Ligue contre le Cancer (Comité Allier), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation BNP-Paribas and Association de Recherche contre le Cancer (ARC), Grant from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche (to MB), Nouveau Chercheur Auvergne (to SB and DHV), ANR Jeune Chercheur (#1103, to DHV).

References

- Abney, T.O., 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 64, 610–617.
- Ananthanarayanan, M., Balasubramanian, N., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Suchy, F.J., 2001. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 28857–28865.
- Appling, D.R., Chytil, F., 1981. Evidence of a role for retinoic acid (vitamin A-acid) in the maintenance of testosterone production in male rats. *Endocrinology* 108, 2120–2124.
- Aquila, S., Bonfiglio, D., Gentile, M., Middea, E., Gabriele, S., Belmonte, M., Catalano, S., Pellegrino, M., Ando, S., 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)gamma is expressed by human spermatozoa: its potential role on the sperm physiology. *J. Cell. Physiol.* 209, 977–986.
- Auwerx, J., 1992. Regulation of gene expression by fatty acids and fibric acid derivatives: an integrative role for peroxisome proliferator activated receptors. The Belgian endocrine society lecture 1992. *Horm. Res.* 38, 269–277.
- Bakke, M., Zhao, L., Hanley, N.A., Parker, K.L., 2001a. SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 171, 5–7.

- Bakke, M., Zhao, L., Parker, K.L., 2001b. Approaches to define the role of SF-1 at different levels of the hypothalamic-pituitary-steroidogenic organ axis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179, 33–37.
- Bantubungi, K., Prawitt, J., Staels, B., 2011. Control of metabolism by nutrient-regulated nuclear receptors acting in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*
- Baranowski, M., 2008. Biological role of liver X receptors. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (Suppl 7), 31–55.
- Barlow, N.J., Foster, P.M., 2003. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* 31, 397–410.
- Bavner, A., Sanyal, S., Gustafsson, J.A., Treuter, E., 2005. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 478–488.
- Bhasin, S., Cunningham, G.R., Hayes, F.J., Matsumoto, A.M., Snyder, P.J., Swerdloff, R.S., Montori, V.M., 2010. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2536–2559.
- Biswas, N.M., Deb, C., 1965. Testicular degeneration in rats during hypervitaminosis A. *Endocrinologie* 49, 64–69.
- Blavy, P., Gondret, F., Guillou, H., Lagarrigue, S., Martin, P.G., van Milgen, J., Radulescu, O., Siegel, A., 2009. A minimal model for hepatic fatty acid balance during fasting: application to PPAR alpha-deficient mice. *J. Theor. Biol.* 261, 266–278.
- Bookout, A.L., Jeong, Y., Downes, M., Yu, R.T., Evans, R.M., Mangelsdorf, D.J., 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell* 126, 789–799.
- Borgius, L.J., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.A., Treuter, E., 2002. Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J. Biol. Chem.* 277, 49761–49766.
- Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss 3rd, J.F., Miller, W.L., 1996. The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 335, 1870–1878.
- Botrugno, O.A., Fayard, E., Annicotte, J.S., Haby, C., Brennan, T., Wendling, O., Tanaka, T., Kodama, T., Thomas, W., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2004. Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Mol. Cell* 15, 499–509.
- Boulogne, B., Levacher, C., Durand, P., Habert, R., 1999. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors in the rat testis during fetal and postnatal development: immunolocalization and implication in the control of the number of gonocytes. *Biol. Reprod.* 61, 1548–1557.
- Bourguiba, S., Genissel, C., Lambard, S., Bouraima, H., Carreau, S., 2003. Regulation of aromatase gene expression in Leydig cells and germ cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 335–343.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksohak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., Hamada, H., Koopman, P., 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312, 596–600.
- Braissant, O., Wahli, W., 1998. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development. *Endocrinology* 139, 2748–2754.
- Brendel, C., Schoonjans, K., Botrugno, O.A., Treuter, E., Auwerx, J., 2002. The small heterodimer partner interacts with the liver X receptor alpha and represses its transcriptional activity. *Mol. Endocrinol.* 16, 2065–2076.
- Brusselmans, K., Timmermans, L., Van de Sande, T., Van Veldhoven, P.P., Guan, G., Shechter, I., Claessens, F., Verhoeven, G., Swinnen, J.V., 2007. Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 282, 18777–18785.
- Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa, T., Richardson, J.A., Parker, K.L., Hobbs, H.H., 1999. Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol. Endocrinol.* 13, 1460–1473.
- Caprio, M., Isidori, A.M., Carta, A.R., Moretti, C., Dufau, M.L., Fabbri, A., 1999. Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 140, 4939–4947.
- Carleton, R.A., Dwyer, J., Finberg, L., Flora, J., Goodman, D.S., Grundy, S.M., Havas, S., Hunter, G.T., Kritchevsky, D., Lauer, R.M., et al., 1991. Report of the expert panel on population strategies for blood cholesterol reduction a statement from the national cholesterol education program, national heart, lung, and blood institute, national institutes of health. *Circulation* 83, 2154–2232.
- Caron, K.M., Soo, S.C., Wetsel, W.C., Stocco, D.M., Clark, B.J., Parker, K.L., 1997. Targeted disruption of the mouse gene encoding steroidogenic acute regulatory protein provides insights into congenital lipid adrenal hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11540–11545.
- Carreau, S., Hess, R.A., 2010. Oestrogens and spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1517–1535.
- Carreau, S., Bois, C., Zanatta, L., Silva, F.R., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2011a. Estrogen signaling in testicular cells. *Life Sci.* 89, 584–587.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., Delalande, C., 2011b. Estrogens in male germ cells. *Spermatogenesis* 1, 90–94.
- Catalano, S., Malivindi, R., Giordano, C., Gu, G., Panza, S., Bonfiglio, D., Lanzino, M., Sisci, D., Panno, M.L., Ando, S., 2010. Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 285, 5581–5593.
- Chalkiadaki, A., Talianidis, I., 2005. SUMO-dependent compartmentalization in promyelocytic leukemia protein nuclear bodies prevents the access of LRH-1 to chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5095–5105.
- Chambon, P., 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10, 940–954.
- Chau, Y.M., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Olson, L.M., Sadovsky, Y., 1997. Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse. *Biol. Reprod.* 57, 765–771.
- Chaudhary, L.R., Hutson, J.C., Stocco, D.M., 1989. Effect of retinol and retinoic acid on testosterone production by rat Leydig cells in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158, 400–406.
- Chen, M., Beaven, S., Tontonoz, P., 2005. Identification and characterization of two alternatively spliced transcript variants of human liver X receptor alpha. *J. Lipid Res.* 46, 2570–2579.
- Chen, H., Ge, R.S., Zirkin, B.R., 2009. Leydig cells: from stem cells to aging. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 9–16.
- Chen, W.D., Wang, Y.D., Meng, Z., Zhang, L., Huang, W., 2011. Nuclear bile acid receptor FXR in the hepatic regeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 888–892.
- Cheng, L., Ding, G., Qin, Q., Huang, Y., Lewis, W., He, N., Evans, R.M., Schneider, M.D., Brako, F.A., Xiao, Y., Chen, Y.E., Yang, Q., 2004. Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. *Nat. Med.* 10, 1245–1250.
- Cho, H.W., Nie, R., Carnes, K., Zhou, Q., Sharief, N.A., Hess, R.A., 2003. The antiestrogen ICI 182,780 induces early effects on the adult male mouse reproductive tract and long-term decreased fertility without testicular atrophy. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 57.
- Corton, J.C., Lapinskas, P.J., 2005. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol. Sci.* 83, 4–17.
- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613–4621.
- Couse, J.E., Mahato, D., Eddy, E.M., Korach, K.S., 2001. Molecular mechanism of estrogen action in the male: insights from the estrogen receptor null mice. *Reprod Fertil Dev* 13, 211–219.
- Cowan, L.A., Barsanti, J.A., Brown, J., Jain, A., 1991. Effects of bacterial infection and castration on prostatic tissue zinc concentration in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 52, 1262–1264.
- Cummins, C.L., Volle, D.H., Zhang, Y., McDonald, J.G., Sion, B., Lefrancois-Martinez, A.M., Caira, F., Veyssiere, G., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., 2006. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J. Clin. Invest.* 116, 1902–1912.
- Cunningham, G.R., Toma, S.M., 2011. Clinical review: why is androgen replacement in males controversial? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 38–52.
- Dadoue, J.P., 1994. The cellular biology of mammalian spermatids: a review. *Bull. Assoc. Anat. (Nancy)* 78, 33–40.
- Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., Garg, R., 2005. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation* 111, 1448–1454.
- Decourteix, M., Volle, D.H., 2010. Endocrine disruptors and fertility: NR0B2, a new therapeutic target? *Med. Sci. (Paris)* 26, 359–361.
- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K.A., Sharpe, R.M., Saunders, P.T., Swinnen, J.V., Verhoeven, G., 2006. The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol. Endocrinol.* 20, 321–334.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., Karpen, S.J., 2001. The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140–147.
- Diemer, T., Allen, J.A., Hales, K.H., Hales, D.B., 2003. Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and steroidogenesis. *Endocrinology* 144, 2882–2891.
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Sassone-Corsi, P., 1998. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13612–13617.
- Ding, E.L., Song, Y., Malik, V.S., Liu, S., 2006. Sex differences of endogenous sex hormones and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 295, 1288–1299.
- Dufau, M.L., 1988. Endocrine regulation and communicating functions of the Leydig cell. *Annu. Rev. Physiol.* 50, 483–508.
- Dufour, J.M., Kim, K.H., 1999. Cellular and subcellular localization of six retinoid receptors in rat testis during postnatal development: identification of potential heterodimeric receptors. *Biol. Reprod.* 61, 1300–1308.
- Duggavathi, R., Volle, D.H., Matak, C., Antal, M.C., Messaddeq, N., Auwerx, J., Murphy, B.D., Schoonjans, K., 2008. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Gene Dev.* 22, 1871–1876.
- Dunkel, L., 2006. Use of aromatase inhibitors to increase final height. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254–255, 207–216.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., Korach, K.S., 1996. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805.
- El-Hajjaji, F.Z., Oumeddour, A., Pommier, A.J., Ouvrier, A., Viennois, E., Dufour, J., Caira, F., Drevet, J.R., Volle, D.H., Baron, S., Saez, F., Lobaccaro, J.M., 2011. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 974–981.
- Endo-Umeda, K., Uno, S., Fujimori, K., Naito, Y., Saito, K., Yamagishi, K., Jeong, Y., Miyachi, H., Tokiwa, H., Yamada, S., Makishima, M., 2012. Differential

- expression and function of alternative splicing variants of human liver \times receptor alpha. *Mol. Pharmacol.* 81, 800–810.
- Enya, M., Horikawa, Y., Kuroda, E., Yonemaru, K., Tonooka, N., Tomura, H., Oda, N., Yokoi, N., Yamagata, K., Shihara, N., Iizuka, K., Saibara, T., Seino, S., Takeda, J., 2008. Mutations in the small heterodimer partner gene increase morbidity risk in Japanese type 2 diabetes patients. *Hum. Mutat.* 29, E271–E277.
- Eskild, W., Ree, A.H., Levy, F.O., Jahnsen, T., Hansson, V., 1991. Cellular localization of mRNAs for retinoic acid receptor-alpha, cellular retinol-binding protein, and cellular retinoic acid-binding protein in rat testis: evidence for germ cell-specific mRNAs. *Biol. Reprod.* 44, 53–61.
- Espana, F., Navarro, S., Medina, P., Zorio, E., Estelles, A., 2007. The role of protein C inhibitor in human reproduction. *Semin. Thromb. Hemost.* 33, 41–45.
- Farnsworth, W.H., Hoeg, J.M., Maher, M., Brittain, E.H., Sherins, R.J., Brewer Jr., H.B., 1987. Testicular function in type II hyperlipoproteinemic patients treated with lovastatin (mevinolin) or neomycin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65, 546–550.
- Fayard, E., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2004. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* 14, 250–260.
- Fernandez-Marcos, P.J., Auwerx, J., Schoonjans, K., 2011. Emerging actions of the nuclear receptor LRH-1 in the gut. *Biochim. Biophys. Acta* 1812, 947–955.
- Fijak, M., Bhushan, S., Meinhardt, A., 2011. Immunoprivileged sites: the testis. *Methods Mol. Biol.* 677, 459–470.
- Foster, P.M., 2006. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int. J. Androl* 29, 140–147, discussion 181–5.
- Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F., Auwerx, J., 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 65, 261–311.
- Frenoux, J.M., Vernet, P., Volle, D.H., Britan, A., Saez, F., Kocer, A., Henry-Berger, J., Mangelsdorf, D.J., Lobaccaro, J.M., Drevet, J.R., 2004. Nuclear oxysterol receptors LXRs, are involved in the maintenance of mouse caput epididymidis structure and functions. *J. Mol. Endocrinol.* 33, 361–375.
- Froment, P., Touraine, P., 2006. Thiazolidinediones and Fertility in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *PPAR Res.* 2006, 73986.
- Fujii, T., 1977. Roles of age and androgen in the regulation of sex accessory organs. *Adv. Sex Horm. Res.* 3, 103–137.
- Gao, D.M., Wang, L.F., Liu, J., Kong, Y.Y., Wang, Y., Xie, Y.H., 2006. Expression of mouse liver receptor homologue 1 in embryonic stem cells is directed by a novel promoter. *FEBS Lett.* 580, 1702–1708.
- Gazouli, M., Yao, Z.X., Boujrad, N., Corton, J.C., Culty, M., Papadopoulos, V., 2002. Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology* 143, 2571–2583.
- Goedeke, L., Fernandez-Hernando, C., 2012. Regulation of cholesterol homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 915–930.
- Gong, H., Guo, P., Zhai, Y., Zhou, J., Uppal, H., Jarzynka, M.J., Song, W.C., Cheng, S.Y., Xie, W., 2007. Estrogen deprivation and inhibition of breast cancer growth in vivo through activation of the orphan nuclear receptor liver X receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 1781–1790.
- Gonzales, G.F., 2001. Function of seminal vesicles and their role on male fertility. *Asian J. Androl.* 3, 251–258.
- Gonzales, G.F., Villena, A., 2001. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. *Int. J. Androl.* 24, 255–260.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., Maloney, P.R., Willson, T.M., Kliewer, S.A., 2000. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, 517–526.
- Grizard, G., Sion, B., Jouanel, P., Benoit, P., Boucher, D., 1995. Cholesterol, phospholipids and markers of the function of the accessory sex glands in the semen of men with hypercholesterolaemia. *Int. J. Androl.* 18, 151–156.
- Guo, J., Tao, S.X., Chen, M., Shi, Y.Q., Zhang, Z.Q., Li, Y.C., Zhang, X.S., Hu, Z.Y., Liu, Y.X., 2007. Heat treatment induces liver receptor homologue-1 expression in monkey and rat Sertoli cells. *Endocrinology* 148, 1255–1265.
- Hageman, J., Herrema, H., Groen, A.K., Kuipers, F., 2010. A role of the bile salt receptor FXR in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1519–1528.
- Haider, S.G., 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.* 233, 181–241.
- Haidl, G., Oppel, C., 1997. Changes in lipids and membrane anisotropy in human spermatozoa during epididymal maturation. *Hum. Reprod.* 12, 2720–2723.
- Hales, D.B., Allen, J.A., Shankara, T., Janus, P., Buck, S., Diemer, T., Hales, K.H., 2005. Mitochondrial function in Leydig cell steroidogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1061, 120–134.
- Hanukoglu, I., 1992. Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 779–804.
- Hase, T., Yoshimura, R., Mitsushashi, M., Segawa, Y., Kawahito, Y., Wada, S., Nakatani, T., Sano, H., 2002. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in human testicular cancer and growth inhibition by its agonists. *Urology* 60, 542–547.
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., Evans, R.M., 2003. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 15712–15717.
- Heng, J.C., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., Lim, B., Ng, H.H., 2010. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6, 167–174.
- Hess, R.A., Gist, D.H., Bunick, D., Lubahn, D.B., Farrell, A., Bahr, J., Cooke, P.S., Greene, G.L., 1997. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the ecurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J. Androl.* 18, 602–611.
- Hevener, A.L., He, W., Barak, Y., Le, J., Bandyopadhyay, G., Olson, P., Wilkes, J., Evans, R.M., Olefsky, J., 2003. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat. Med.* 9, 1491–1497.
- Higashiyama, H., Billin, A.N., Okamoto, Y., Kinoshita, M., Asano, S., 2007. Expression profiling of peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR-delta) in mouse tissues using tissue microarray. *Histochem. Cell Biol.* 127, 485–494.
- Hinshelwood, M.M., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Mendelson, C.R., 2005. Temporal and spatial expression of liver receptor homologue-1 (LRH-1) during embryogenesis suggests a potential role in gonadal development. *Dev. Dyn.* 234, 159–168.
- Horton, J.D., Shimano, H., Hamilton, R.L., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1999. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J. Clin. Invest.* 103, 1067–1076.
- Hotaling, J.M., Walsh, T.J., 2009. Male infertility: a risk factor for testicular cancer. *Nat. Rev. Urol.* 6, 550–556.
- Hou, J.W., Collins, D.C., Schleicher, R.L., 1990. Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology* 127, 2047–2055.
- Hozoji-Inada, M., Munehira, Y., Nagao, K., Kioka, N., Ueda, K., 2011. Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* 286, 20117–20124.
- Hu, M.C., Hsu, N.C., Pai, C.I., Wang, C.K., Chung, B., 2001. Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. *Mol. Endocrinol.* 15, 812–818.
- Hua, X., Sakai, J., Ho, Y.K., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1995. Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J. Biol. Chem.* 270, 29422–29427.
- Huang, J.C., 2008. The role of peroxisome proliferator-activated receptors in the development and physiology of gametes and preimplantation embryos. *PPAR Res.* 2008, 732303.
- Hung, C.C., Farooqi, I.S., Ong, K., Luan, J., Keogh, J.M., Pembrey, M., Yeo, G.S., Dunger, D., Wareham, N.J., S. O.R., 2003. Contribution of variants in the small heterodimer partner gene to birthweight, adiposity, and insulin levels: mutational analysis and association studies in multiple populations. *Diabetes* 52, 1288–1291.
- Iguchi, T., Watanabe, H., Katsu, Y., 2001. Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish, and frogs: a mini-review. *Horm. Behav.* 40, 248–251.
- Ikeda, Y., Shen, W.H., Ingraham, H.A., Parker, K.L., 1994. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. *Mol. Endocrinol.* 8, 654–662.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H., Parker, K.L., 1995. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol. Endocrinol.* 9, 478–486.
- Im, S.S., Osborne, T.F., 2011. Liver x receptors in atherosclerosis and inflammation. *Circ. Res.* 108, 996–1001.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., Gerard, R.D., Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., 2005. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2, 217–225.
- Ingraham, H.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Shen, W.H., Nachtigal, M.W., Abbud, R., Nilson, J.H., Parker, K.L., 1994. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Gene Dev.* 8, 2302–2312.
- Isidori, A.M., Caprio, M., Strollo, F., Moretti, C., Fragele, G., Isidori, A., Fabbri, A., 1999. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 3673–3680.
- Ismail, N., Morales, C., Clermont, Y., 1990. Role of spermatogonia in the stage-synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin-A-deficient rats. *Am. J. Anat.* 188, 57–63.
- Jay, M.A., Ren, J., 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr. Diabetes Rev.* 3, 33–39.
- Jeffs, B., Ito, M., Yu, R.N., Martinson, F.A., Wang, Z.J., Doglio, L.T., Jameson, J.L., 2001. Sertoli cell-specific rescue of fertility, but not testicular pathology, in Dax1 (Ahch)-deficient male mice. *Endocrinology* 142, 2481–2488.
- Jegou, B., 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* 147, 25–96.
- Jeyasuria, P., Ikeda, Y., Jamin, S.P., Zhao, L., De Rooij, D.G., Themmen, A.P., Behringer, R.R., Parker, K.L., 2004. Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol. Endocrinol.* 18, 1610–1619.
- Jiang, M., Strand, D.W., Franco, O.E., Clark, P.E., Hayward, S.W., 2011. PPARgamma: a molecular link between systemic metabolic disease and benign prostate hyperplasia. *Differentiation* 82, 220–236.
- Johansson, L., Thomsen, J.S., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G., Gustafsson, J.A., Treuter, E., 1999. The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ERalpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* 274, 345–353.
- Johnson, L., Thompson Jr., D.L., Varner, D.D., 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 23–51.
- Jones, R., 1998. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 73–84.

- Juul, A., Skakkebaek, N.E., 2002. Testosterone treatment of elderly men. The so called andropause doesn't exist. *Ugeskr. Laeger* 164, 4941–4942.
- Kaeding, J., Bouchaert, E., Belanger, J., Caron, P., Chouinard, S., Verreault, M., Larouche, O., Pelletier, G., Stael, B., Belanger, A., Barbier, O., 2008. Activators of the farnesoid X receptor negatively regulate androgen glucuronidation in human prostate cancer LNCAP cells. *Biochem. J.* 410, 245–253.
- Kaplan, S.A., Meehan, A.G., Shah, A., 2006. The age related decrease in testosterone is significantly exacerbated in obese men with the metabolic syndrome What are the implications for the relatively high incidence of erectile dysfunction observed in these men? *J. Urol.* 176, 1524–1527, discussion 1527–8.
- Kastner, P., Mark, M., Leid, M., Gansmuller, A., Chin, W., Grondona, J.M., Decimo, D., Krezel, W., Dierich, A., Chambon, P., 1996. Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Gene Dev.* 10, 80–92.
- Kasturi, S.S., Tannir, J., Brannigan, R.E., 2008. The metabolic syndrome and male infertility. *J. Androl.* 29, 251–259.
- Kemper, J.K., Kim, H., Miao, J., Bhalla, S., Bae, Y., 2004. Role of an mSin3A-Swi/Snf chromatin remodeling complex in the feedback repression of bile acid biosynthesis by SHP. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7707–7719.
- Kerr, J.B., 1991. Ultrastructure of the seminiferous epithelium and intertubular tissue of the human testis. *J. Electron Microsc. Tech.* 19, 215–240.
- Kerr, J.B., de Kretser, D.M., 1974. Proceedings: the role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 36, 439–440.
- Khaw, K.T., Dowsett, M., Folkard, E., Bingham, S., Wareham, N., Luben, R., Welch, A., Day, N., 2007. Endogenous testosterone and mortality due to all causes, cardiovascular disease, and cancer in men: European prospective investigation into cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk) Prospective Population Study. *Circulation* 116, 2694–2701.
- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., Tres, L.L., 2007. Molecular biology of sperm head shaping. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 65, 33–43.
- Kim, H.J., Andersson, L.C., Bouton, D., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2009. Stromal growth and epithelial cell proliferation in ventral prostates of liver X receptor knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 558–563.
- Kolettis, P.N., 2003. Evaluation of the subfertile man. *Am. Fam. Physician* 67, 2165–2172.
- Korach-Andre, M., Archer, A., Gabbi, C., Barros, R.P., Pedrelli, M., Steffensen, K.R., Pettersson, A.T., Laurencikienė, J., Parini, P., Gustafsson, J.A., 2011a. Liver X receptors regulate de novo lipogenesis in a tissue-specific manner in C57BL/6 female mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E210–E222.
- Korach-Andre, M., Archer, A., Barros, R.P., Parini, P., Gustafsson, J.A., 2011b. Both liver-X receptor (LXR) isoforms control energy expenditure by regulating brown adipose tissue activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 403–408.
- Krishnamurthy, H., Danilovich, N., Morales, C.R., Sairam, M.R., 2000. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol. Reprod.* 62, 1146–1159.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., Eto, K., Tsubamoto, Y., Okuno, A., Murakami, K., Sekihara, H., Hasegawa, G., Naito, M., Toyoshima, Y., Tanaka, S., Shiota, K., Kitamura, T., Fujita, T., Ezaki, O., Aizawa, S., Kadowaki, T., et al., 1999. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol. Cell* 4, 597–609.
- Kupelian, V., Page, S.T., Araujo, A.B., Travison, T.G., Bremner, W.J., McKinlay, J.B., 2006. Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 843–850.
- Laaksonen, D.E., Niskanen, L., Punnonen, K., Nyyssonen, K., Tuominen, T.P., Valkonen, V.P., Salonen, R., Salonen, J.T., 2004. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care* 27, 1036–1041.
- Laughlin, G.A., Barrett-Connor, E., Bergstrom, J., 2008. Low serum testosterone and mortality in older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 68–75.
- Lavorgna, G., Karim, F.D., Thummel, C.S., Wu, C., 1993. Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of Drosophila metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3004–3008.
- Law, G.L., McGuinness, M.P., Linder, C.C., Griswold, M.D., 1997. Expression of apolipoprotein E mRNA in the epithelium and interstitium of the testis and the epididymis. *J. Androl.* 18, 32–42.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., Gonzalez, F.J., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol. Cell. Biol.* 15, 3012–3022.
- Lee, Y.K., Choi, Y.H., Chua, S., Park, Y.J., Moore, D.D., 2006. Phosphorylation of the hinge domain of the nuclear hormone receptor LRH-1 stimulates transactivation. *J. Biol. Chem.* 281, 7850–7855.
- Lee, J.H., Gong, H., Khadem, S., Lu, Y., Gao, X., Li, S., Zhang, J., Xie, W., 2008. Androgen deprivation by activating the liver X receptor. *Endocrinology* 149, 3778–3788.
- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J.L., Melner, M.H., 1997. Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 272, 7960–7967.
- Lefebvre, P., Cariou, B., Lien, F., Kuipers, F., Stael, B., 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.* 89, 147–191.
- Lefevre, A., Rogier, E., Astraud, C., Duquenne, C., Finaz, C., 1994. Regulation by retinoids of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor, cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta (5–4)-isomerase and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P-450 messenger ribonucleic acid levels in the K9 mouse Leydig cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 106, 31–39.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M., 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–3140.
- Li, H., Palczewski, K., Baehr, W., Clagett-Dame, M., 2011a. Vitamin A deficiency results in meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse testis. *Biol. Reprod.* 84, 336–341.
- Li, Y., Ramdhan, D.H., Naito, H., Yamagishi, N., Ito, Y., Hayashi, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Tamada, H., Gonzalez, F.J., Nakajima, T., 2011b. Ammonium perfluorooctanoate may cause testosterone reduction by adversely affecting testis in relation to PPARalpha. *Toxicol. Lett.* 205, 265–272.
- Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Pairault, C., Levacher, C., Habert, R., 2002. Regulation and perturbation of testicular functions by vitamin A. *Reproduction* 124, 173–180.
- Livera, G., Pairault, C., Lambrot, R., Lelievre-Pegorier, M., Saez, J.M., Habert, R., Rouiller-Fabre, V., 2004. Retinoid-sensitive steps in steroidogenesis in fetal and neonatal rat testes: in vitro and in vivo studies. *Biol. Reprod.* 70, 1814–1821.
- Lobaccaro, J.M., Repa, J.J., Lu, T.T., Caira, F., Henry-Berger, J., Volle, D.H., Mangelsdorf, D.J., 2001. Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 62, 239–247.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., Mangelsdorf, D.J., 2000. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* 6, 507–515.
- Lubahn, D.B., Moyer, J.S., Golding, T.S., Couse, J.F., Korach, K.S., Smithies, O., 1993. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 11162–11166.
- Lufkin, T., Lohnes, D., Mark, M., Dierich, A., Gorry, P., Gaub, M.P., LeMour, M., Chambon, P., 1993. High postnatal lethality and testis degeneration in retinoic acid receptor alpha mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7225–7229.
- Luo, Y., Tall, A.R., 2000. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J. Clin. Invest.* 105, 513–520.
- Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., 1994. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481–490.
- Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K.L., 1995. The cell-specific nuclear receptor steroidogenic factor 1 plays multiple roles in reproductive function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 350, 279–283.
- Luo, X., Ikeda, Y., Lala, D., Rice, D., Wong, M., Parker, K.L., 1999. Steroidogenic factor 1 (SF-1) is essential for endocrine development and function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69, 13–18.
- Maeda, T., Miyata, M., Yotsumoto, T., Kobayashi, D., Nozawa, T., Toyama, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y., Tamai, I., 2004. Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice. *Mol. Pharm.* 1, 281–289.
- Maggio, M., Lauretani, F., Ceda, G.P., Bandinelli, S., Basaria, S., Paolisso, G., Ble, A., Egan, J.M., Metter, E.J., Abbatecola, A.M., Zuliani, G., Ruggiero, C., Valenti, G., Guralnik, J.M., Ferrucci, L., 2007. Association of hormonal dysregulation with metabolic syndrome in older women: data from the InCHIANTI study. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E353–E358.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., Shan, B., 1999. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- Manna, P.R., Chandrala, S.P., King, S.R., Jo, Y., Counis, R., Huhtaniemi, I.T., Stocco, D.M., 2006. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor-I mediated regulation of the steroidogenic acute regulatory protein in mouse leydig cells. *Mol. Endocrinol.* 20, 362–378.
- Martin, P.G., Guillou, H., Lasserre, F., Dejean, S., Lan, A., Pascucci, J.M., Sancristobal, M., Legrand, P., Besse, P., Pineau, T., 2007. Novel aspects of PPARalpha-mediated regulation of lipid and xenobiotic metabolism revealed through a nutrigenomic study. *Hepatology* 45, 767–777.
- Mascaro, C., Nadal, A., Hegardt, F.G., Marrero, P.F., Haro, D., 2000. Contribution of steroidogenic factor 1 to the regulation of cholesterol synthesis. *Biochem. J.* 350 (Pt 3), 785–790.
- Mascres, B., Mark, M., Dierich, A., Ghyselinck, N.B., Kastner, P., Chambon, P., 1998. The RXRalpha ligand-dependent activation function 2 (AF-2) is important for mouse development. *Development* 125, 4691–4707.
- Mascres, B., Ghyselinck, N.B., Watanabe, M., Annicotte, J.S., Chambon, P., Auwerx, J., Mark, M., 2004. Ligand-dependent contribution of RXRbeta to cholesterol homeostasis in Sertoli cells. *EMBO Rep.* 5, 285–290.
- Matsumoto, A.M., 2002. Andropause: clinical implications of the decline in serum testosterone levels with aging in men. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 57, M76–M99.
- Matt, N., Ghyselinck, N.B., Wendling, O., Chambon, P., Mark, M., 2003. Retinoic acid-induced developmental defects are mediated by RARbeta/RXR heterodimers in the pharyngeal endoderm. *Development* 130, 2083–2093.
- McCabe, E.R., 2007. DAX1: increasing complexity in the roles of this novel nuclear receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 179–182.
- Meacham, S.J., Nieschlag, E., Simoni, M., 2001. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 561–571.
- Meeks, J.J., Russell, T.A., Jeffs, B., Huhtaniemi, I., Weiss, J., Jameson, J.L., 2003. Leydig cell-specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *Biol. Reprod.* 69, 154–160.
- Meistrich, M.L., Mohapatra, B., Shirley, C.R., Zhao, M., 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma* 111, 483–488.

- Mimeault, C., Woodhouse, A.J., Miao, X.S., Metcalfe, C.D., Moon, T.W., Trudeau, V.L., 2005. The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 73, 44–54.
- Miyata, M., Matsuda, Y., Tsuchiya, H., Kitada, H., Akase, T., Shimada, M., Nagata, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y., 2006. Chenodeoxycholic acid-mediated activation of the farnesoid X receptor negatively regulates hydroxysteroid sulfotransferase. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21, 315–323.
- Morales, C.R., Marat, A.L., Ni, X., Yu, Y., Oko, R., Smith, B.T., Argraves, W.S., 2008. ATP-binding cassette transporters ABCA1, ABCA7, and ABCG1 in mouse spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 472–477.
- Motamed Khorasani, A., Cheung, A.P., Lee, C.Y., 2000. Cholesterol inhibitory effects on human sperm-induced acrosome reaction. *J. Androl.* 21, 586–594.
- Mueller, M., Cima, I., Noti, M., Fuhrer, A., Jakob, S., Dubuquoy, L., Schoonjans, K., Brunner, T., 2006. The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *J. Exp. Med.* 203, 2057–2062.
- Niederberger, C., 2005. Atorvastatin and male infertility: is there a link? *J. Androl.* 26, 12.
- Nishigori, H., Tomura, H., Tonooka, N., Kanamori, M., Yamada, S., Sho, K., Inoue, I., Kikuchi, N., Onigata, K., Kojima, I., Kohama, T., Yamagata, K., Yang, Q., Matsuzawa, Y., Miki, T., Seino, S., Kim, M.Y., Choi, H.S., Lee, Y.K., Moore, D.D., Takeda, J., 2001. Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japanese subjects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 575–580.
- Ogden, C.L., Carroll, M.D., Flegal, K.M., 2003. Epidemiologic trends in overweight and obesity. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 32, 741–760, vii.
- Ortlund, E.A., Lee, Y., Solomon, I.H., Hager, J.M., Safi, R., Choi, Y., Guan, Z., Tripathy, A., Raetz, C.R., McDonnell, D.P., Moore, D.D., Redinbo, M.R., 2005. Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 357–363.
- Ouvrier, A., Cadet, R., Vernet, P., Laillet, B., Chardigny, J.M., Lobaccaro, J.M., Drevet, J.R., Saez, F., 2009. LXR and ABCA1 control cholesterol homeostasis in the proximal mouse epididymis in a cell-specific manner. *J. Lipid Res.* 50, 1766–1775.
- Ozbay, T., Rowan, A., Leon, A., Patel, P., Sewer, M.B., 2006. Cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent sphingosine-1-phosphate biosynthesis induces human CYP17 gene transcription by activating cleavage of sterol regulatory element binding protein 1. *Endocrinology* 147, 1427–1437.
- Padron, R.S., Mas, J., Zamora, R., Riverol, F., Licea, M., Mallea, L., Rodriguez, J., 1989. Lipids and testicular function. *Int. Urol. Nephrol.* 21, 515–519.
- Park, M.J., Kong, H.J., Kim, H.Y., Kim, H.H., Kim, J.H., Cheong, J.H., 2007. Transcriptional repression of the gluconeogenic gene PEPCK by the orphan nuclear receptor SHP through inhibitory interaction with C/EBPalpha. *Biochem. J.* 402, 567–574.
- Parker, K.L., Rice, D.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N.A., Stallings, N., Schimmer, B.P., 2002. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. *Recent Prog. Horm. Res.* 57, 19–36.
- Parton, R.G., Hancock, J.F., 2004. Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends Cell Biol.* 14, 141–147.
- Pasquali, R., Casimirri, F., De lasio, R., Mesini, P., Boschi, S., Chierici, R., Flaminia, R., Biscotti, M., Vicennati, V., 1995. Insulin regulates testosterone and sex hormone-binding globulin concentrations in adult normal weight and obese men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 654–658.
- Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol. Reprod.* 52, 217–225.
- Peet, D.J., Janowski, B.A., Mangelsdorf, D.J., 1998. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 571–575.
- Peet, D.J., Turlay, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., Mangelsdorf, D.J., 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.
- Pelusi, C., Ikeda, Y., Zubair, M., Parker, K.L., 2008. Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 79, 1074–1083.
- Pentikainen, V., Erkkila, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L., 2000. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2057–2067.
- Perrard, M.H., Durand, P., 2009. Redundancy of the effect of TGFbeta1 and beta-NGF on the second meiotic division of rat spermatocytes. *Microsc. Res. Tech.* 72, 596–602.
- Perri, M., Pingitore, A., Cione, E., Vilardi, E., Perrone, V., Genchi, G., 2010. Proliferative and anti-proliferative effects of retinoic acid at doses similar to endogenous levels in Leydig MLTC-1/R2C/TM-3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 993–1001.
- Peters, J.M., Lee, S.S., Li, W., Ward, J.M., Gavrilova, O., Everett, C., Reitman, M.L., Hudson, L.D., Gonzalez, F.J., 2000. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol. Cell. Biol.* 20, 5119–5128.
- Pezzi, V., Sirianni, R., Chimento, A., Maggolini, M., Bourguiba, S., Delalande, C., Carreau, S., Ando, S., Simpson, E.R., Clyne, C.D., 2004. Differential expression of steroidogenic factor-1/adrenal A binding protein and liver receptor homolog-1 (LRH-1)/fetoprotein transcription factor in the rat testis: LRH-1 as a potential regulator of testicular aromatase expression. *Endocrinology* 145, 2186–2196.
- Pitteloud, N., Hardin, M., Dwyer, A.A., Valassi, E., Yialamas, M., Elahi, D., Hayes, F.J., 2005. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2636–2641.
- Plymate, S.R., Jones, R.E., Matej, L.A., Friedl, K.E., 1988. Regulation of sex hormone binding globulin (SHBG) production in Hep G2 cells by insulin. *Steroids* 52, 339–340.
- Pommier, A.J., Alves, G., Viennois, E., Bernard, S., Communal, Y., Sion, B., Marceau, G., Damon, C., Mouzat, K., Cairra, F., Baron, S., Lobaccaro, J.M., 2010. Liver X Receptor activation downregulates AKT survival signaling in lipid rafts and induces apoptosis of prostate cancer cells. *Oncogene* 29, 2712–2723.
- Purvis, K., Christiansen, E., 1992. Male infertility: current concepts. *Ann. Med.* 24, 259–272.
- Quinn, P., Begley, A.J., 1984. Effect of human seminal plasma and mouse accessory gland extracts on mouse fertilization in vitro. *Aust. J. Biol. Sci.* 37, 147–152.
- Ramirez-Torres, M.A., Carrera, A., Zambrana, M., 2000. High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol. Obstet. Mex.* 68, 224–229.
- Rejzaji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., Drevet, J.R., 2006. Lipid remodeling of murine epididymosomes and spermatozoa during epididymal maturation. *Biol. Reprod.* 74, 1104–1113.
- Renga, B., Mencarelli, A., D'Amore, C., Cipriani, S., Baldelli, F., Zampella, A., Distrutti, E., Fiorucci, S., 2012. Glucocorticoid receptor mediates the gluconeogenic activity of the farnesoid X receptor in the fasting condition. *FASEB J.*
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2000. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 459–481.
- Repa, J.J., Mangelsdorf, D.J., 2002. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat. Med.* 8, 1243–1248.
- Repa, J.J., Berge, K.E., Pomajzl, C., Richardson, J.A., Hobbs, H., Mangelsdorf, D.J., 2002. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* 277, 18793–18800.
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., Graves, K.H., McLachlan, R.I., Simpson, E.R., 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7986–7991.
- Robertson, K.M., Schuster, G.U., Steffensen, K.R., Hovatta, O., Meaney, S., Hultenby, K., Johansson, L.C., Svechnikov, K., Soder, O., Gustafsson, J.A., 2005. The liver X receptor-(beta) is essential for maintaining cholesterol homeostasis in the testis. *Endocrinology* 146, 2519–2530.
- Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., Mortensen, R.M., 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Meachem, S.J., 2010. Hormonal regulation of male germ cell development. *J. Endocrinol.* 205, 117–131.
- Saad, F., 2009. The role of testosterone in type 2 diabetes and metabolic syndrome in men. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 53, 901–907.
- Saez, J.M., 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr. Rev.* 15, 574–626.
- Saez, F., Chabory, E., Cadet, R., Vernet, P., Baron, S., Lobaccaro, J.M., Drevet, J.R., 2007. Liver X receptors and epididymal epithelium physiology. *Asian J. Androl.* 9, 574–582.
- Saez Lancellotti, T.E., Boarelli, P.V., Monclus, M.A., Cabrilla, M.E., Clementi, M.A., Espinola, L.S., Cid Barria, J.L., Vincenti, A.E., Santi, A.G., Fornes, M.W., 2010. Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS One* 5, e13457.
- Schimmer, B.P., White, P.C., 2010. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol. Endocrinol.* 24, 1322–1337.
- Schlegel, P.N., Girardi, S.K., 1997. Clinical review 87: In vitro fertilization for male factor infertility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 709–716.
- Schteingart, H.F., Meroni, S.B., Canepa, D.F., Pellizzari, E.H., Cigorraga, S.B., 1999. Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur. J. Endocrinol.* 141, 539–545.
- Schultz, R., Yan, W., Toppari, J., Volk, A., Gustafsson, J.A., Pelto-Huikko, M., 1999. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha messenger ribonucleic acid and protein in human and rat testis. *Endocrinology* 140, 2968–2975.
- Sebastiani, C., Vincenzo, F., Tommaso, C., Giuseppe, S., Marco, R., Ivana, C., Giorgio, R., Massimo, M., Giuseppe, M., 2012. Dietary patterns and prostatic diseases. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 4, 195–204.
- Sekido, R., Lovell-Badge, R., 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 453, 930–934.
- Selva, D.M., Hirsch-Reinshagen, V., Burgess, B., Zhou, S., Chan, J., McIsaac, S., Hayden, M.R., Hammond, G.L., Vogl, A.W., Wellington, C.L., 2004. The ATP-binding cassette transporter 1 mediates lipid efflux from Sertoli cells and influences male fertility. *J. Lipid Res.* 45, 1040–1050.
- Seol, W., Choi, H.S., Moore, D.D., 1996. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science* 272, 1336–1339.
- Sethell, B.P., 2008. Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 212–233.
- Shalaby, M.A., el-Zorba, H.Y., Kamel, G.M., 2004. Effect of alpha-tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats. *Pharmacol. Res.* 50, 137–142.
- Sharpe, R.M., Kerr, J.B., McKinnell, C., Millar, M., 1994. Temporal relationship between androgen-dependent changes in the volume of seminiferous tubule fluid, lumen size and seminiferous tubule protein secretion in rats. *J. Reprod. Fertil.* 101, 193–198.

- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S., 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769–784.
- Shea-Eaton, W.K., Trinidad, M.J., Lopez, D., Nackle, A., McLean, M.P., 2001. Sterol regulatory element binding protein-1 α regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Endocrinology* 142, 1525–1533.
- Sheweita, S.A., Tilmisany, A.M., Al-Sawaf, H., 2005. Mechanisms of male infertility: role of antioxidants. *Curr. Drug Metab.* 6, 495–501.
- Shiraishi, K., Matsuyama, H., 2012. Local expression of epidermal growth factor-like growth factors in human testis and its role in spermatogenesis. *J. Androl.* 33, 66–73.
- Sierens, J., Jakody, I., Poobalan, Y., Meachem, S.J., Knowler, K., Young, M.J., Sirianni, R., Pezzi, V., Clyne, C.D., 2010. Localization and regulation of aromatase liver receptor homologue-1 in the developing rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323, 307–313.
- Sikka, S.C., Wang, R., 2008. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J. Androl.* 10, 134–145.
- Simoni, M., Weinbauer, G.F., Gromoll, J., Nieschlag, E., 1999. Role of FSH in male gonadal function. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 60, 102–106.
- Simons, K., Ikonen, E., 2000. How cells handle cholesterol. *Science* 290, 1721–1726.
- Sinal, C.J., Tohkin, M., Miyata, M., Ward, J.M., Lambert, G., Gonzalez, F.J., 2000. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell* 102, 731–744.
- Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V., Rainey, W.E., 2002. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* 174, R13–R17.
- Skakkebaek, N.E., Rajpert-De Meyts, E., Main, K.M., 2001. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum. Reprod.* 16, 972–978.
- Skakkebaek, N.E., Jorgensen, N., Main, K.M., Rajpert-De Meyts, E., Leffers, H., Andersson, A.M., Juul, A., Carlsen, E., Mortensen, G.K., Jensen, T.K., Toppari, J., 2006. Is human fecundity declining? *Int. J. Androl.* 29, 2–11.
- Skinner, M.K., 1991. Cell–cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* 12, 45–77.
- Smith, M.R., Lee, H., Nathan, D.M., 2006. Insulin sensitivity during combined androgen blockade for prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91, 1305–1308.
- Song, G., Park, K., Wang, L., 2009. Gene expression profiling reveals a diverse array of pathways inhibited by nuclear receptor SHP during adipogenesis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2, 275–285.
- Steffensen, K.R., Gustafsson, J.A., 2004. Putative metabolic effects of the liver X receptor (LXR). *Diabetes* 53 (Suppl 1), S36–S42.
- Stocco, D.M., Sodeman, T.C., 1991. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. *J. Biol. Chem.* 266, 19731–19738.
- Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R., 2005. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol. Endocrinol.* 19, 2647–2659.
- Strain, G.W., Zumoff, B., Kream, J., Strain, J.J., Deucher, R., Rosenfeld, R.S., Levin, J., Fukushima, D.K., 1982. Mild Hypogonadotropic hypogonadism in obese men. *Metabolism* 31, 871–875.
- Streicher, R., Kotzka, J., Muller-Wieland, D., Siemeister, G., Munck, M., Avci, H., Krone, W., 1996. SREBP-1 mediates activation of the low density lipoprotein receptor promoter by insulin and insulin-like growth factor-I. *J. Biol. Chem.* 271, 7128–7133.
- Sultan, C., Lobaccaro, J.M., Belon, C., Terraza, A., Lumbroso, S., 1992. Molecular biology of disorders of sex differentiation. *Horm. Res.* 38, 105–113.
- Sultan, C., Lumbroso, S., Poujol, N., Belon, C., Boudon, C., Lobaccaro, J.M., 1993. Mutations of androgen receptor gene in androgen insensitivity syndromes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 519–530.
- Suzuki, T., Kasahara, M., Yoshioka, H., Morohashi, K., Umehara, K., 2003. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 238–249.
- Swales, K.E., Korbonsits, M., Carpenter, R., Walsh, D.T., Warner, T.D., Bishop-Bailey, D., 2006. The farnesoid X receptor is expressed in breast cancer and regulates apoptosis and aromatase expression. *Cancer Res.* 66, 10120–10126.
- Swinnen, J.V., Brusselmans, K., Verhoeven, G., 2006. Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 358–365.
- Tabbi-Anneni, I., Cooksey, R., Gunda, V., Liu, S., Mueller, A., Song, G., McClain, D.A., Wang, L., 2010. Overexpression of nuclear receptor SHP in adipose tissues affects diet-induced obesity and adaptive thermogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E961–E970.
- Tajima, K., Yoshii, K., Fukuda, S., Orisaka, M., Miyamoto, K., Amsterdam, A., Kotsuji, F., 2005. Luteinizing hormone-induced extracellular-signal regulated kinase activation differently modulates progesterone and androstenedione production in bovine theca cells. *Endocrinology* 146, 2903–2910.
- Tamai, K.T., Monaco, L., Alatalo, T.P., Lalli, E., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., 1996. Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. *Mol. Endocrinol.* 10, 1561–1569.
- Tapanainen, J.S., Aittomaki, K., Min, J., Vaskivuo, T., Huhtaniemi, I.T., 1997. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat. Genet.* 15, 205–206.
- Thomas, K., Sung, D.Y., Chen, X., Thompson, W., Chen, Y.E., McCarrey, J., Walker, W., Griswold, M., 2011. Developmental patterns of PPAR and RXR gene expression during spermatogenesis. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 3, 1209–1220.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B.M., 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Trauner, M., Claudel, T., Fickert, P., Moustafa, T., Wagner, M., 2010. Bile acids as regulators of hepatic lipid and glucose metabolism. *Dig. Dis.* 28, 220–224.
- Travis, A.J., Kopf, G.S., 2002. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. *J. Clin. Invest.* 110, 731–736.
- Tucci, P., Cione, E., Perri, M., Genchi, G., 2008. All-trans-retinoic acid induces apoptosis in Leydig cells via activation of the mitochondrial death pathway and antioxidant enzyme regulation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 315–323.
- Vacca, M., Degirolamo, C., Mariani-Costantini, R., Palasciano, G., Moschetta, A., 2011. Lipid-sensing nuclear receptors in the pathophysiology and treatment of the metabolic syndrome. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 3, 562–587.
- Val, P., Martinez-Barbera, J.P., Swain, A., 2007. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. *Development* 134, 2349–2358.
- Valledor, A.F., 2005. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology* 210, 127–132.
- Velasco-Santamaria, Y.M., Korsgaard, B., Madsen, S.S., Bjerregaard, P., 2011. Bezafibrate, a lipid-lowering pharmaceutical, as a potential endocrine disruptor in male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 105, 107–118.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., Tontonoz, P., 2000a. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 12097–12102.
- Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.M., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., Edwards, P.A., 2000b. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J. Biol. Chem.* 275, 14700–14707.
- Verhoeven, G., 1992. Local control systems within the testis. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 313–333.
- Verhoeven, G., 2005. A Sertoli cell-specific knock-out of the androgen receptor. *Andrologia* 37, 207–208.
- Verhoeven, G., Willems, A., Denolet, E., Swinnen, J.V., De Gendt, K., 2010. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365, 1537–1556.
- Vermeulen, A., 1996. Decreased androgen levels and obesity in men. *Ann. Med.* 28, 13–15.
- Vermeulen, A., 2000. Senile hypogonadism in man and hormone replacement therapy. *Acta Med. Austriaca* 27, 11–17.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Rochette-Egly, C., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., Ghyselinck, N.B., Mark, M., 2006. Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology* 147, 96–110.
- Vernet, N., Dennefeld, C., Klopstein, M., Ruiz, A., Bok, D., Ghyselinck, N.B., Mark, M., 2008. Retinoid X receptor beta (RXRB) expression in Sertoli cells controls cholesterol homeostasis and spermiogenesis. *Reproduction* 136, 619–626.
- Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., Lobaccaro, J.M., 2011. Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.
- Viennois, E., Esposito, T., Dufour, J., Pommier, A., Fabre, S., Kemeny, J.L., Guy, L., Morel, L., Lobaccaro, J.M., Baron, S., 2012. Lxralpha Regulates the Androgen Response in Prostate Epithelium. *Endocrinology*.
- Vilain, E., McCabe, E.R., 1998. Mammalian sex determination: from gonads to brain. *Mol. Genet. Metab.* 65, 74–84.
- Vivat, V., Zechel, C., Wurtz, J.M., Bourguet, W., Kagechika, H., Umekiya, H., Shudo, K., Moras, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., 1997. A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* 16, 5697–5709.
- Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., 2007a. Role of the nuclear receptors for oxysterols LXRs in steroidogenic tissues: beyond the “foie gras”, the steroids and sex? *Mol. Cell. Endocrinol.* 265–266, 183–189.
- Volle, D.H., Mouzat, K., Duggavathi, R., Siddeek, B., Dechelotte, P., Sion, B., Veyssiere, G., Benahmed, M., Lobaccaro, J.M., 2007b. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol. Endocrinol.* 21, 1014–1027.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.M., Verhoeven, G., Schoonjans, K., Auwerx, J., 2007c. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Gene Dev.* 21, 303–315.
- Volle, D.H., Decourteix, M., Garo, E., McNeilly, J., Fenichel, P., Auwerx, J., McNeilly, A.S., Schoonjans, K., Benahmed, M., 2009. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J. Clin. Invest.* 119, 3752–3764.
- Walsh, T.J., Croughan, M.S., Schembri, M., Chan, J.M., Turek, P.J., 2009. Increased risk of testicular germ cell cancer among infertile men. *Arch. Intern. Med.* 169, 351–356.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., Forman, B.M., 1999. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, 543–553.
- Wang, Z.J., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J.C., Yu, R.N., Hales, D.B., Jameson, J.L., 2001a. Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7988–7993.

- Wang, Z.N., Bassett, M., Rainey, W.E., 2001b. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 255–258.
- Wang, W., Zhang, C., Marimuthu, A., Krupka, H.I., Tabrizi, M., Shelloe, R., Mehra, U., Eng, K., Nguyen, H., Settachatgul, C., Powell, B., Milburn, M.V., West, B.L., 2005a. The crystal structures of human steroidogenic factor-1 and liver receptor homologue-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7505–7510.
- Wang, X., Shen, C.L., Dyson, M.T., Eimerl, S., Orly, J., Hutson, J.C., Stocco, D.M., 2005b. Cyclooxygenase-2 regulation of the age-related decline in testosterone biosynthesis. *Endocrinology* 146, 4202–4208.
- Wang, L., Huang, J., Saha, P., Kulkarni, R.N., Hu, M., Kim, Y., Park, K., Chan, L., Rajan, A.S., Lee, I., Moore, D.D., 2006a. Orphan receptor small heterodimer partner is an important mediator of glucose homeostasis. *Mol. Endocrinol.* 20, 2671–2681.
- Wang, S., Lai, K., Moy, F.J., Bhat, A., Hartman, H.B., Evans, M.J., 2006b. The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* 147, 4025–4033.
- Wang, G., Weng, C.C., Shao, S.H., Zhou, W., de Gendt, K., Braun, R.E., Verhoeven, G., Meistrich, M.L., 2009a. Androgen receptor in Sertoli cells is not required for testosterone-induced suppression of spermatogenesis, but contributes to Sertoli cell organization in Utp14b jsd mice. *J. Androl.* 30, 338–348.
- Wang, R.S., Yeh, S., Tzeng, C.R., Chang, C., 2009b. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 30, 119–132.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Moore, D.D., Auwerx, J., 2004. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113, 1408–1418.
- Wathes, D.C., Abayasekara, D.R., Aitken, R.J., 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. Reprod.* 77, 190–201.
- Wei, D., Tao, R., Zhang, Y., White, M.F., Dong, X.C., 2011. Feedback regulation of hepatic gluconeogenesis through modulation of SHP/Nr0b2 gene expression by Sirt1 and FoxO1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 300, E312–E320.
- Whitby, R.J., Stec, J., Blind, R.D., Dixon, S., Leesnitzer, L.M., Orband-Miller, L.A., Williams, S.P., Willson, T.M., Xu, R., Zuercher, W.J., Cai, F., Ingraham, H.A., 2011. Small molecule agonists of the orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and liver receptor homologue-1 (LRH-1, NR5A2). *J. Med. Chem.* 54, 2266–2281.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J., Fukumizu, A., 2004. Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J. Biol. Chem.* 279, 23158–23165.
- Yanagimachi, R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote* 2, 371–372.
- Yang, F.M., Pan, C.T., Tsai, H.M., Chiu, T.W., Wu, M.L., Hu, M.C., 2009. Liver receptor homolog-1 localization in the nuclear body is regulated by sumoylation and cAMP signaling in rat granulosa cells. *FEBS J.* 276, 425–436.
- Yefimova, M.G., Sow, A., Fontaine, I., Guillemot, V., Martinat, N., Crepieux, P., Canepa, S., Maurel, M.C., Fouchecourt, S., Reiter, E., Benzakour, O., Guillou, F., 2008. Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 78, 697–704.
- Yokoyama, S., 2000. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. *Biochim. Biophys. Acta* 1529, 231–244.
- Yoshida, S., 2010. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Dev. Growth Differ.* 52, 311–317.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A., Jameson, J.L., 1998. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20, 353–357.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R., et al., 1994. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635–641.
- Zeng, L., Liao, H., Liu, Y., Lee, T.S., Zhu, M., Wang, X., Stemberman, M.B., Zhu, Y., Shyy, J.Y., 2004. Sterol-responsive element-binding protein (SREBP) 2 down-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in vascular endothelial cells: a novel role of SREBP in regulating cholesterol metabolism. *J. Biol. Chem.* 279, 48801–48807.
- Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., Schulman, I.G., 2012. Liver LX/Ralpha expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 1688–1699.
- Zhao, L., Bakke, M., Krimkevich, Y., Cushman, L.J., Parlow, A.F., Camper, S.A., Parker, K.L., 2001a. Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. *Development* 128, 147–154.
- Zhao, L., Bakke, M., Parker, K.L., 2001b. Pituitary-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Mol. Cell. Endocrinol.* 185, 27–32.
- Zhu, R., Ou, Z., Ruan, X., Gong, J., 2012. Role of liver X receptors in cholesterol efflux and inflammatory signaling (review). *Mol. Med. Report.* 5, 895–900.
- Ziglioli, F., Maestroni, U., Dinale, F., Ciuffreda, M., Cortellini, P., 2011. Carcinoma in situ (CIS) of the testis. *Acta Biomed.* 82, 162–169.

Annexe VII

Identification of the link between hypothalamo-pituitary axis 1 and the testicular orphan nuclear 2 receptor NR0B2 in male mice.

Vega A, Martinot E, Baptissart M, de Haze A, Saru JP, Baron S, Caira F, Shoonjans K, Lobaccaro JMA, Volle DH,

Endocrinology, 2015

Identification of the Link Between the Hypothalamo-Pituitary Axis and the Testicular Orphan Nuclear Receptor NR0B2 in Adult Male Mice

Aurélié Vega, Emmanuelle Martinot, Marine Baptissart, Angélique De Haze, Jean-Paul Saru, Silvére Baron, Françoise Caira, Kristina Schoonjans, Jean-Marc A. Lobaccaro, and David H. Volle

Inserm Unit 1103 (A.V., E.M., M.B., A.D.H., J.-P.S., S.B., F.C., J.-M.A.L., D.H.V.), Génétique Reproduction et Développement (GReD), Boîte Postale 80026; Clermont Université (A.V., E.M., M.B., A.D.H., J.-P.S., S.B., F.C., J.-M.A.L., D.H.V.), Université Blaise Pascal, GReD; and Centre National de la Recherche Scientifique (A.V., E.M., M.B., A.D.H., J.-P.S., S.B., F.C., J.-M.A.L., D.H.V.), Unité Mixte de recherche 6293, GReD, F-63170 Aubière Cedex, France; Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne (A.V., E.M., M.B., A.D.H., J.-P.S., S.B., F.C., J.-M.A.L., D.H.V.), F-63000 Clermont-Ferrand Cedex, France; and Institute of Bioengineering (K.S.), Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland

The small heterodimer partner (SHP, nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2; NR0B2) is an atypical nuclear receptor known mainly for its role in bile acid homeostasis in the enterohepatic tract. We previously showed that NR0B2 controls testicular functions such as testosterone synthesis. Moreover, NR0B2 mediates the deleterious testicular effects of estrogenic endocrine disruptors leading to infertility. The endocrine homeostasis is essential for health, because it controls many physiological functions. This is supported by a large number of studies demonstrating that alterations of steroid activity lead to several kinds of diseases such as obesity and infertility. Within the testis, the functions of the Leydig cells are mainly controlled by the hypothalamo-pituitary axis via LH/chorionic gonadotropin (CG). Here, we show that LH/CG represses *Nr0b2* expression through the protein kinase A-AMP protein kinase pathway. Moreover, using a transgenic mouse model invalidated for *Nr0b2*, we point out that NR0B2 mediates the repression of testosterone synthesis and subsequent germ cell apoptosis induced by exposure to anti-GnRH compound. Together, our data demonstrate a new link between hypothalamo-pituitary axis and NR0B2 in testicular androgen metabolism, making NR0B2 a major actor of testicular physiology in case of alteration of LH/CG levels. (*Endocrinology* 156: 660–669, 2015)

Within the testis, Leydig cells ensure the synthesis of various hormones. Androgens are involved in the development of secondary sexual characters during puberty and the maintenance of fertility in the adulthood (1).

Testosterone (T) controls germ cell proliferation and survival (2, 3). Steroidogenesis is a multistep process. First, cholesterol is transported through the mitochondrial membrane by steroidogenic acute regulatory protein

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received May 23, 2014. Accepted November 18, 2014.

First Published Online November 26, 2014

Abbreviations: ACC, acetyl-CoA carboxylase; AG, antagonist GNRH-receptor; AICAR, 5-Aminimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, Acadesine, N1-(β -D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide; AMPK, AMP protein kinase; 8BrcAMP, 8-Bromo-cAMP; C-cpd, C-compound inhibitor; CG, chorionic gonadotropin; CREB, cAMP response element-binding protein; CYP11A1, cytochrome P450-11A1; CYP17A1, cytochrome P450-17A1; E2, estradiol; EB, E2 benzoate; EED, estrogenic endocrine disrupter; Fsk, forskolin; H89, protein kinase A inhibitor H89; hCG, human chorionic gonadotropin; HP, hypothalamo-pituitary; 3 β HSD, 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase; LRH-1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2; LXR α , nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3; NR5A1, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1; NR5A2, nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2; NR0B2, nuclear receptor subfamily 0 group B member 2; P, phosphorylated; PDE, phospho-diesterase; PKA, protein kinase A; PKI, protein kinase A inhibitor; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; T, testosterone; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling.

(StAR) (4) or peripheral benzodiazepine receptor (5). Then, cholesterol side chain is cleaved by cytochrome P450-11A1 (Cytochrome P450, Family 11, Subfamily A, Polypeptide 1, CYP11A1) producing pregnenolone (6). Several subsequent enzymatic reactions involving 3 β -hydroxy-steroid dehydrogenase (3 β HSD) and cytochrome P450-17A1 (Cytochrome P450, Family 17, Subfamily A, Polypeptide 1, CYP17A1) allow the production of T (7).

The control of the Leydig cell functions, including steroidogenesis, is predominantly mediated by the hypothalamo-pituitary-gonadal axis via LH/chorionic gonadotropin (CG) depending on the considered species (7). This results in de novo protein synthesis such as StAR (8). Under acute effect of LH/CG, free cholesterol is transferred to the inner membrane of mitochondria. Chronic stimulation leads to the expression of *Cyp11a1*, *3 β hsd*, and *Cyp17a1* (9). Among multiple signaling pathways, LH/CG stimulates cAMP production, which in turn regulates expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. cAMP acts through a variety of transcription factors, including SF1 (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1, NR5A1) (10), DAX-1 (nuclear receptor subfamily 0, group A, member 1, NR0B1) (11), LXR (nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3, NR1H3) (12, 13), CCAAT/enhancer-binding protein- β (14), LRH-1 (nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2, NR5A2) (15), NR4A1 (nuclear receptor subfamily 4 group A member 1) (nerve growth factor IB) (16), and cAMP response element-binding protein (CREB) (17).

In a classical negative feedback loop, the steroids produced by the testis, namely T and estrogens, inhibit the secretion of GnRH by the hypothalamus and then the production of gonadotropins (LH and FSH). Steroids also inhibit LH secretion directly at the pituitary levels.

The small heterodimer partner (nuclear receptor subfamily 0 group B member 2, NR0B2) is a member of the nuclear receptor superfamily (18). Functions of NR0B2 have been linked to its ability to repress the transcriptional activity of other nuclear receptors such as NR5A2 (19, 20). In addition to the liver, *Nr0b2* has been demonstrated to be expressed in the testis. From puberty *Nr0b2* is expressed in interstitial cells (21). It represses steroidogenesis by limiting the expression of *Star*, *Cyp11a1*, and *3βhsd*. NR0B2 inhibits the expression of steroidogenic genes, on one hand by inhibiting the expression of the nuclear receptors *Nr5a1* and *Nr5a2*, and on other hand by directly repressing the transcriptional activity of NR5A2 at least on the promoter of *Star* and *Cyp11a1* genes (21). This was supported by the higher T levels in *Nr0b2*^{-/-} males compare with *Nr0b2*^{+/+} mice (21). This effect is mainly due to the intrinsic testicular role of NR0B2, as *Nr0b2*^{-/-} males

have normal plasma LH levels and normally respond to LH/CG stimulation (21). However, NR0B2 mediates testicular deleterious effects of estrogenic endocrine disruptors (EEDs) such as diethylstilbestrol ((DES) or estradiol (E2) benzoate (EB) (22). An interesting point is the lack of effect of EB in *Nr0b2*^{-/-} males as neonatal exposure to EB has been demonstrated to reduce plasma LH concentration (23). Combined, these data suggest that *Nr0b2*^{-/-} Leydig cells should be resistant to the deleterious effect of low LH levels. Surprisingly, the links between NR0B2 and the LH/CG signaling pathways within Leydig cells have never been studied so far.

Here, we show that *Nr0b2* expression is regulated by the hypothalamo-pituitary (HP) axis. In vivo treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) results in the decrease of testicular *Nr0b2* mRNA accumulation. In vitro approaches, using the well-defined mouse Leydig MA10 cell line, demonstrate the involvement of protein kinase A (PKA)-AMP protein kinase (AMPK) signaling pathways. Consistently, we show that administration of an antagonist of GnRH-receptor (AG) induces an increase of *Nr0b2* mRNA accumulation leading to lower T synthesis. This suggests a potential role of NR0B2 in the testicular impact of HP axis on testicular physiology. This was corroborated by the fact that *Nr0b2* deficiency protects male mice against the harmful effect on germ cell survival induced by an AG.

Materials and Methods

Animals

Mice used were previously described (21) and maintained on a mixed background (C57BL/6J/129sv) and were housed in controlled temperature rooms with 12-hour light, 12-hour dark cycles and had ad libitum access to food and water.

Mice were injected sc with hCG (5 IU, equivalent to 1.42mM; Sigma-Aldrich) diluted in NaCl 0.09%. Regarding anti-GnRH (antagonist GNRH-receptor-045572; Tocris) experiments, males were gavaged with 10 mg/kg during 12 hours or 3 days, or with vehicle (methylcellulose 1%; Sigma-Aldrich). This study was conducted in accordance with current regulations and standards approved by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Animal Care Committee.

Histology

Testes from 10-week-old mice were collected, formalin fixed, and embedded in paraffin, and 5- μ m-thick sections were prepared and stained with hematoxylin/eosin (n = 5–10 animals per group).

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) analysis

TUNEL experiments were performed as previously described (24) on 5 μ m of testis fixed in paraformaldehyde 4%. In each

Table 1. Antibodies

Peptide/ Protein Target	Antigen Sequence (if known)	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog Number, and/or Name of Individual Providing the Antibody	Species Raised in; Monoclonal or Polyclonal	Dilution Used
Phospho-ACC			Cell signaling, 3661	Rabbit	1:2000
ACC			Cell signaling, 23662	Rabbit	1:2000
Phospho-AMPK			Cell signaling, 2531	Rabbit	1:2000
AMPK			Cell signaling, 2532	Rabbit	1:2000
TUBULIN			Sigma-Aldrich	Mouse	1:30 000

testis, at least 100 random seminiferous tubules were counted. Results are expressed as the number of TUNEL-positive cells per 100 seminiferous tubules.

Endocrine investigations

T concentration was measured on heparin-treated plasma. Intratesticular T was extracted as previously described (see reference 27 below). A commercial kit (Assay Designs) was used for the assays.

Real-time RT-PCR

RNAs from testis samples were isolated using TRIzol (Invitrogen Corp). cDNA was synthesized from total RNA with the SuperScript II First-Strand Synthesis System (Life Technologies) and random hexamer primers. Real-time PCR measurement of individual cDNAs was performed using SYBR green dye to measure duplex DNA formation with the Eppendorf Realplex system. Sequences of the primers were given in previous studies: *Actin*, *Star*, *Cyp11a1* (13), *36b4* (12), *Nr0b2*, *Lrh-1*, and *Sf-1* (25). Standard curves were generated with pools of testis cDNA from animals with different genotypes and/or treatments. Results were analyzed using the delta-delta-cycle threshold values method.

Cell culture experiments

MA10 cells were previously used (26) and were maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ with Waymouth (Life Technologies) containing 100-U/mL penicillin and 100-μg/mL streptomycin supplemented with 10% horse serum. On day 0, MA10 cells were seeded at 400 × 10³ cells per well in 6-well plates and allowed to adhere overnight. The next day, cells were washed twice with 1 × PBS, and medium without serum was applied with various ligands or vehicles. For hCG experiments, vehicle was NaCl 0.09%, for forskolin (Fsk) (Sigma-Aldrich), 8-Bromo-cAMP (8Br-cAMP) (Sigma-Aldrich), protein kinase A inhibitor (PKI) (R&D Systems), protein kinase A inhibitor H89 (H89) (Sigma-Aldrich), and PD098059 (R&D Systems) vehicle was dimethylsulfoxide (1:1000; Sigma-Aldrich). Cells were harvested for mRNA or protein extractions.

Transient transfections

Mouse and human *Nr0b2* promoter luciferase reporter plasmids have been previously described (27). Briefly, *Nr0b2* regulatory sequences were cloned in pGL3 Luciferase Reporter Vector plasmid and correspond to sequence of –601 and +1 bp or –366 to +1 bp from the transcription initiation site. MA10 cells were transfected with lipofectamin (Invitrogen) in 24-well plates. *Nr0b2* promoter luciferase reporter construct (90 ng) was

transfected together with expression plasmid encoding for β-galactosidase (90 ng). The quantity of DNA was maintained constant by addition of empty pCMX vector to a total amount of 240 ng of DNA per well. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with vehicle, hCG, or Fsk. Cells were harvested 4 hours later and assayed for luciferase and β-galactosidase activities. Luciferase values were normalized to β-galactosidase activity.

Western blot analysis

Protein extracts (30 μg) from whole testis or MA10 cells were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary polyclonal antibodies raised against AMPK (2532; Cell Signaling), phosphorylated (P)-AMPK (2531; Cell Signaling), acetyl-CoA carboxylase (ACC) (3662; Cell Signaling), P-ACC (Ser79) (3661; Cell Signaling), or TUBULIN (1:30 000; Sigma-Aldrich) (for antibodies, see Table 1) followed by a 1-hour incubation with peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse IgG (1:10 000; Sigma-Aldrich). Peroxidase activity was detected using the Western Light System (PerkinElmer Life Sciences).

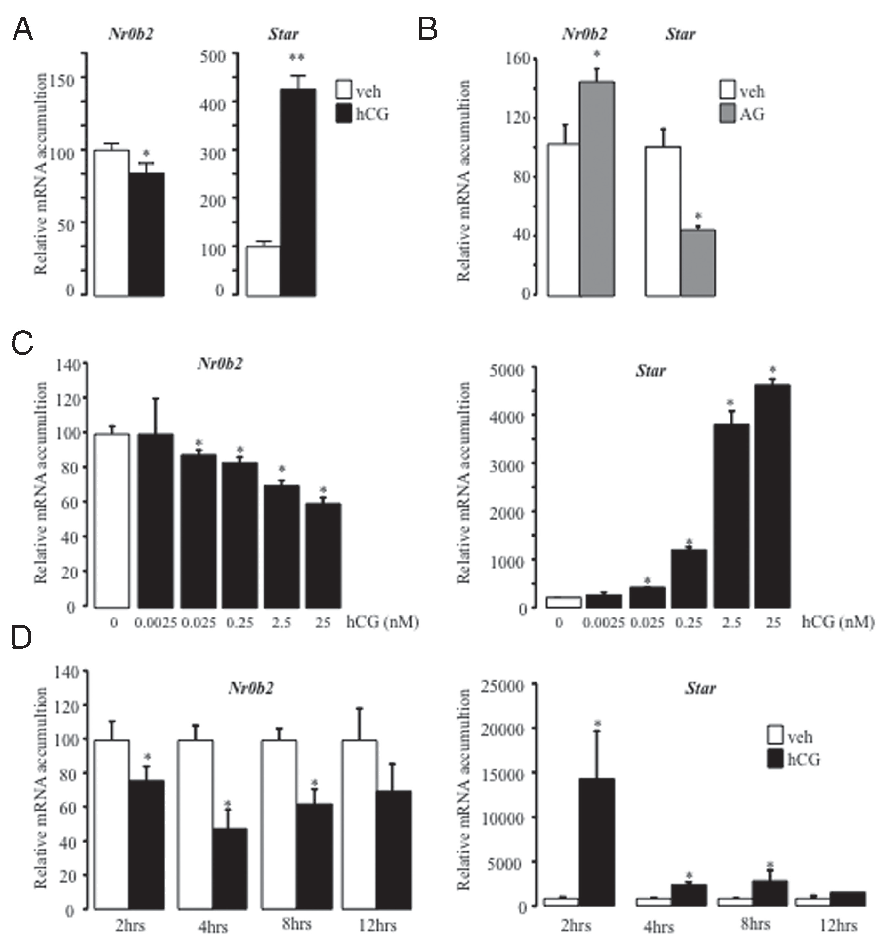
Statistical analysis

Two-way ANOVA was performed. When significant effects of treatment or genotype or their interactions were obtained, multiple comparisons were made with Turkey's test. All numerical data are represented as mean ± SEM. Significant difference was set at *P* < .05.

Results

hCG decreases *Nr0b2* expression

To define in vivo the potential link between *Nr0b2* and LH/CG signaling pathway, we first analyzed the impact of LH/CG on *Nr0b2* mRNA expression; twelve hours after treatment with 5 IU of hCG resulted in a significant decrease in *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 1A). In the same line of evidence, treatment of male mice with a GnRH-receptor antagonist (antagonist GNRH-receptor-045572; AG) induced *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 1B and Supplemental Figure 1A). Note that *Star* mRNA accumulations mirror those obtained for *Nr0b2* (Figure 1, A and B). To test whether LH/CG directly induces these effects on *Nr0b2* within the Leydig cells, we performed in vitro analyses using the well-characterized



mouse MA10 Leydig cell line. *Nr0b2* was decreased after hCG exposure due to a dose of 0.025 ng; the highest effect was observed at 25nM (Figure 1C). The effect of hCG on *Nr0b2* accumulation was observed since 2 hours up to 12 hours after treatment (Figure 1D). As expected, *Star* mRNA accumulations mirror those obtained for *Nr0b2* (Figure 1, C and D).

***Nr0b2* repression by hCG involves cAMP-PKA signaling pathway**

In order to decipher the downstream signaling pathways induced by the LH/CG receptor, we used the adenylate cyclase activator, Fsk in vitro experiment using MA10 Leydig cell line. Results show that Fsk induced the repression of *Nr0b2* accumulation at 2.5 μ M and after 4 hours of treatment (Figure 2, A and B). As expected, *Star*

mRNA accumulation was increased after exposure to Fsk (Figure 2, A and B).

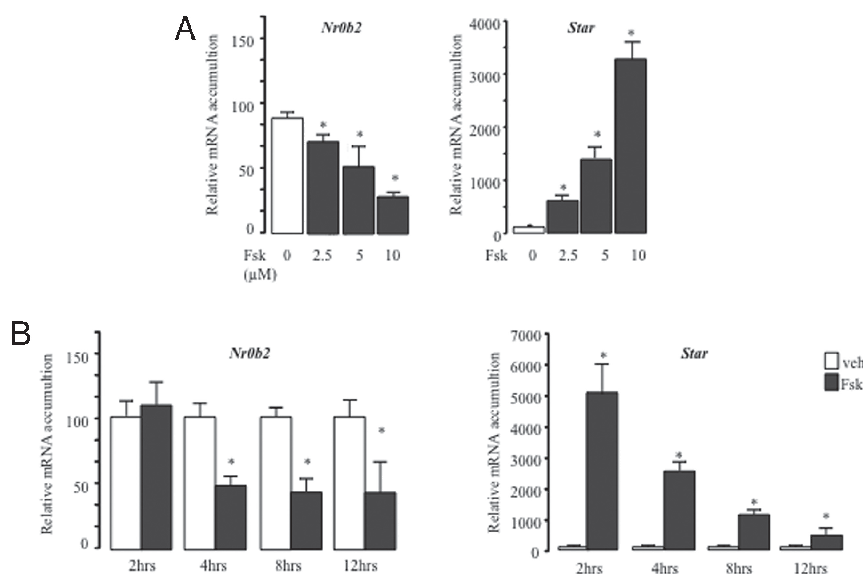
The involvement of cAMP pathway was confirmed using 8BrcAMP (Figure 3A). Treatment for 4 hours with 8BrcAMP resulted in *Nr0b2* repression and induction of *Star* mRNA accumulation (Figure 3A). In Leydig cells, PKA pathways play an important role in the control of steroidogenesis (28). To define whether PKA was involved in *Nr0b2* regulation by cAMP, we used PKI and H89, 2 pharmacological inhibitors of PKA. Pretreatment with PKI or H89 abolished the effect of hCG on *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 3, B and C). The efficiency of PKI or H89 treatments was supported by their impacts on hCG-induced *Star* expression (Figure 3, B and C). This is also highlighted by the induction of CREB phosphorylation by hCG, which was minored by PKI and H89 exposures (Figure 3D). The role of PKA was confirmed, using PKI or H89, by the measurement of steroids (Figure 3E). In contrast, the use of PD98059, an inhibitor of ERK pathways, has only a slight impact on *Nr0b2* and *Star* expression (Supplemental Figure 1, B and C).

hCG signaling pathways act on *Nr0b2* regulatory sequences

In order to show a direct impact of LH/CG signaling pathways on *Nr0b2* regulating sequences, various luciferase constructs of either mouse or human region of the *Nr0b2* promoter were used (20). hCG or Fsk treatments significantly repress luciferase activity using the -601;+1bp-luc construct, whereas the short construct (-333;+1pb) was not responsive to hCG or Fsk (Figure 4). Same results were obtained using the human *NR0B2* promoter (data not shown).

AMPK signaling pathways repress *Nr0b2* expression in response to hCG

Recently, AMPK signaling pathway was demonstrated to play some role in the regulation of Leydig steroidogenesis (29). The functionality of AMPK signaling pathway in MA10 cells was tested using pharmacological approach



with its activator 5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, Acadesine, N1-(β -D-Ribofuranosyl)-5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICAR) and the C-compound inhibitor (C-cpd). AICAR exposure increased the level of AMPK phosphorylation (P-AMPK) and of its target P-ACC (Figure 5, A and B, left) (29). In contrast, the use of C-cpd counteracted the effect of AICAR on P-AMPK and P-ACC (Figure 5, A and B, right). Because AMPK pathway is a known inducer of *Nr0b2* expression in liver (30), the potential involvement of these pathways in MA10 cells was then tested. Treatment of MA10 cells with AICAR led to an increase of *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 5C). Consistently, pretreatment with C-compound abolished the effect of AICAR on *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 5C).

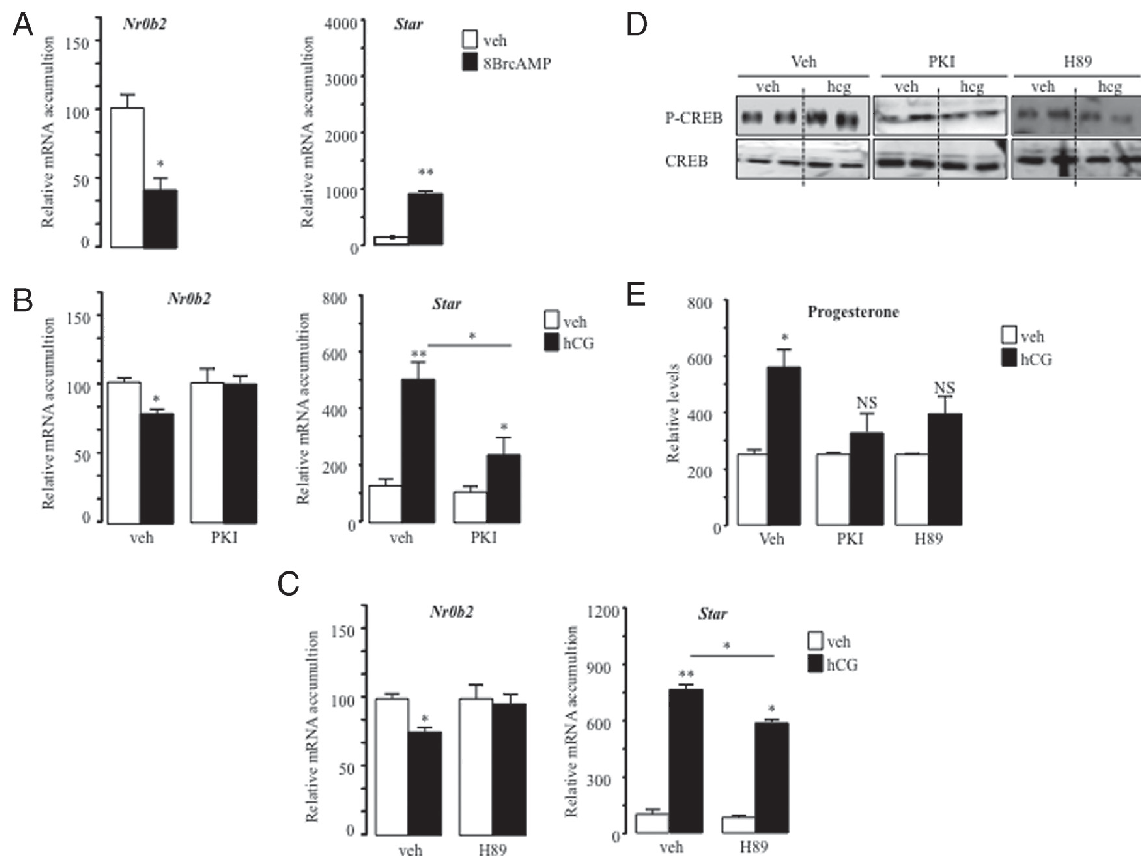
The link between AMPK pathway and hCG response was then analyzed. Pretreatment of cells with AICAR abolished the effect of hCG on *Nr0b2* mRNA accumulation (Figure 5D). hCG exposure led to decreased phosphorylation of AMPK (Figure 5, E and F, left). The impact of this modification was supported by the lower phosphorylation of ACC, a known target of AMPK (Figure 5, E and F, left). The pretreatment with AICAR counteract the impact of hCG on P-AMPK and then P-ACC (Figure 5, E and F, right). In vitro, the impact of hCG on AMPK and ACC was confirmed using FSK on MA10 cell line (Supplemental Figure 1D). In the same line of evidence, 8BrcAMP led to a decrease of AMPK and

ACC phosphorylations (Supplemental Figure 1E). The role of PKA was supported by the fact that PKI counteracted effect of hCG on P-AMPK and P-ACC (Supplemental Figure 1F).

In addition, in vivo exposure of *Nr0b2*^{+/+} mice to hCG reduced P-AMPK (Figure 5, G and H). This was correlated with the decrease of the levels of P-ACC (Figure 5, G and H). These data show that, in vivo, hCG exposure led to a decrease of P-AMPK as observed in MA10 Leydig cell line. It is thus tempting to speculate that AMPK activation could regulate *Nr0b2* expression in response to LH/CG within the Leydig cells. However, it is important to note that AMPK and its targets have also been described in several cell types within the testis, including Sertoli and germ cells (31).

***Nr0b2* deficiency protects mice from germ cell loss induced by an anti-GnRH**

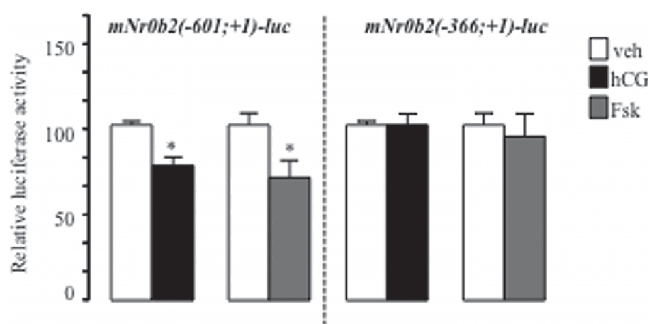
As previously demonstrated (21), *Nr0b2*^{-/-} males presented higher intratesticular T levels (Supplemental Figure 2A). To analyze the impact of NR0B2 in response to the modulation of HP axis, 10-week-old adult *Nr0b2*^{+/+} or *Nr0b2*^{-/-} male mice were treated with a GnRH receptor antagonist (AG). Interestingly, 12 hours of treatment with AG led to a decreased intratesticular levels of T in *Nr0b2*^{+/+} mice, whereas no effect was observed in the *Nr0b2*^{-/-} males (Figure 6A). The effect of AG was mainly supported by the HP axis as AG did not decrease expression of *Nr0b2* in MA10 Leydig cell line (Supplemental Figure 2B). The effect of AG on T synthesis in wild-type males was transitory, because after 3 days of treatment, the intratesticular levels of T were normalized (Supplemental Figure 2C). Consistent with decreased T levels, 12 hours after the treatment, a decrease in mRNA levels of *Lhcgr*, *Star*, and *Cyp11a1* was observed in *Nr0b2*^{+/+} males (Figure 6B), whereas no modification of these genes was seen in *Nr0b2*^{-/-} males (Figure 6B). The expression of *Nr5a1* and *Nr5a2*, which are known inducers of steroidogenesis and targets of NR0B2, were not affected by AG (Figure 6C). Moreover, AG had no effect on the expression of the negative regulator of steroidogenesis *Nr0b1* (Figure 6C). These results suggest that the effect of NR0B2 might be through its ability of inhibiting NR5A2 and/or NR5A1 activities on the regulatory sequences of the steroidogenic genes as previously



demonstrated (21). These results show that NR0B2 is a key local factor of Leydig homeostasis.

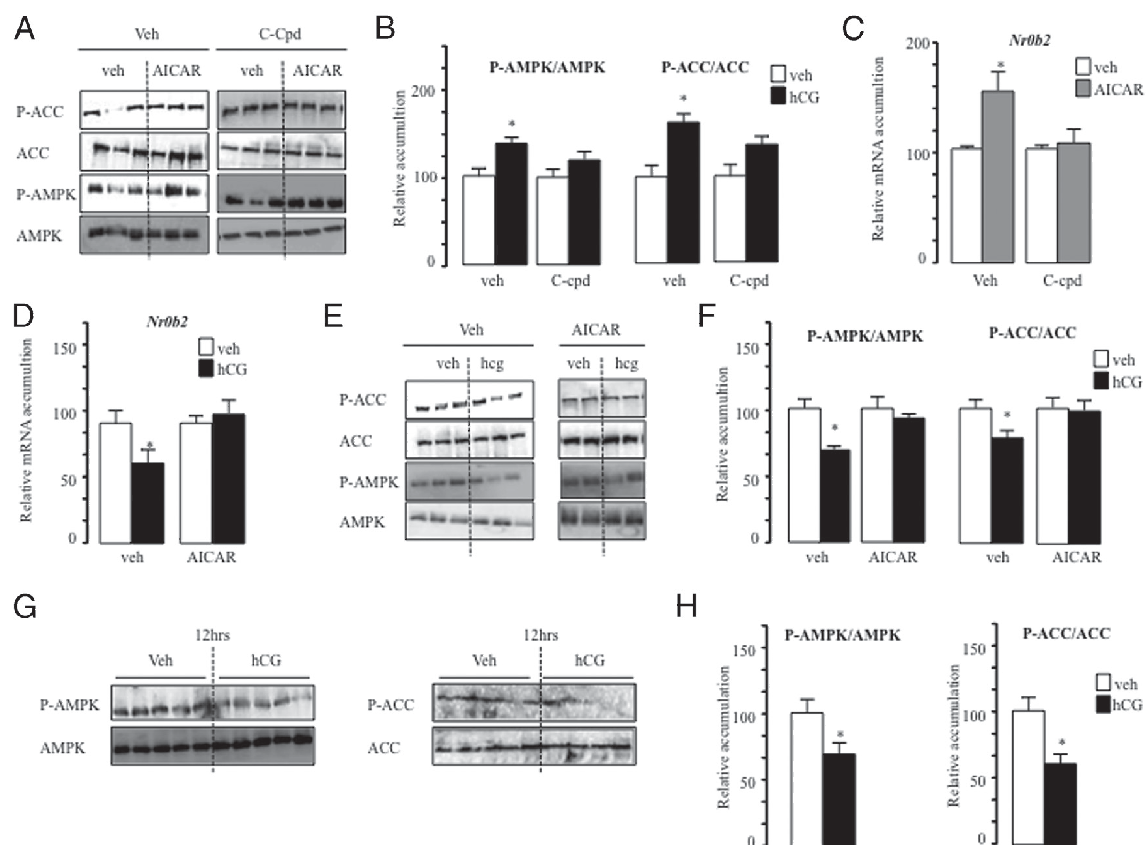
Consistent with the lower T levels in *Nr0b2*^{+/+} mice (Figure 6A), a significant decrease of seminal vesicle weight, an androgen-dependent organ, was observed at

3 days after the beginning of the AG treatment (Figure 6D). No effect on vesicle seminals was observed in *Nr0b2*^{-/-} males, highlighting the critical role of NR0B2 (Figure 6D). Likewise, AG exposure induced a significant increase in apoptotic spermatogenic cells in the testis of *Nr0b2*^{+/+} mice, as determined by TUNEL analysis (Figure 6, E and F). Such impact was not observed in *Nr0b2*^{-/-} males.



Discussion

Endocrine homeostasis is a critical physiological process, because alteration could lead to various diseases. This point has been enlightened in the last decades with the large impact of endocrine disruptors on animal and human health (32, 33). Among the factors defined to play important roles in steroid homeostasis, NR0B2 has been demonstrated to control male sexual maturity through testicular physiology (21).



It has been previously proposed that NR0B2 might contribute to local regulation of steroidogenesis (21). Indeed, *Nr0b2*^{-/-} males have higher T levels. Moreover, in vitro experiments show that NR0B2 overaccumulation has been demonstrated to repress the expression of steroidogenic genes via NR5A1 and/or NR5A2. However, the testicular regulation of *Nr0b2* expression has not been explored so far.

Previous data led us to hypothesize that NR0B2 should be involved in the control of basal expression of steroidogenic genes. However, we point out that *Nr0b2* expression is increased in case of lower activity of HP axis leading to decreased LH/CG levels and repressing T synthesis. At the molecular level, we show that *Nr0b2* expression is controlled within the Leydig cells by cAMP/PKA/AMPK pathway after LH/CG exposure. The link between NR0B2 and LH/CG signaling was demonstrated here using an inhibitor of the HP axis (AG). This effect was associated

with an increased apoptosis of germ cells after AG exposure. This involvement of NR0B2 is supported by the fact that *Nr0b2*^{-/-} males are protected from the deleterious effects induced by AG exposure. The presented results lead us to propose a new model regarding the role of NR0B2 in the control of the steroidogenesis that could be relevant in cases of altered HP axis function (Figure 7).

In a physiological situation, LH is pulsately secreted by pituitary and interacts with its receptor on the Leydig cells. This will increase the intracellular concentration of cAMP and activate PKA. Stimulated PKA will thus induce the production of steroids by the well-known pathway CREB/P-CREB, as shown in Figure 7. Our data clearly point out a new regulatory pathway where NR0B2 plays an important role. Indeed, stimulated PKA will diminish AMPK activation, which in turn results in the repression of *Nr0b2* expression. Finally, T and E2 will have their physiological effects on target organs. Among them, T and E2 will exert

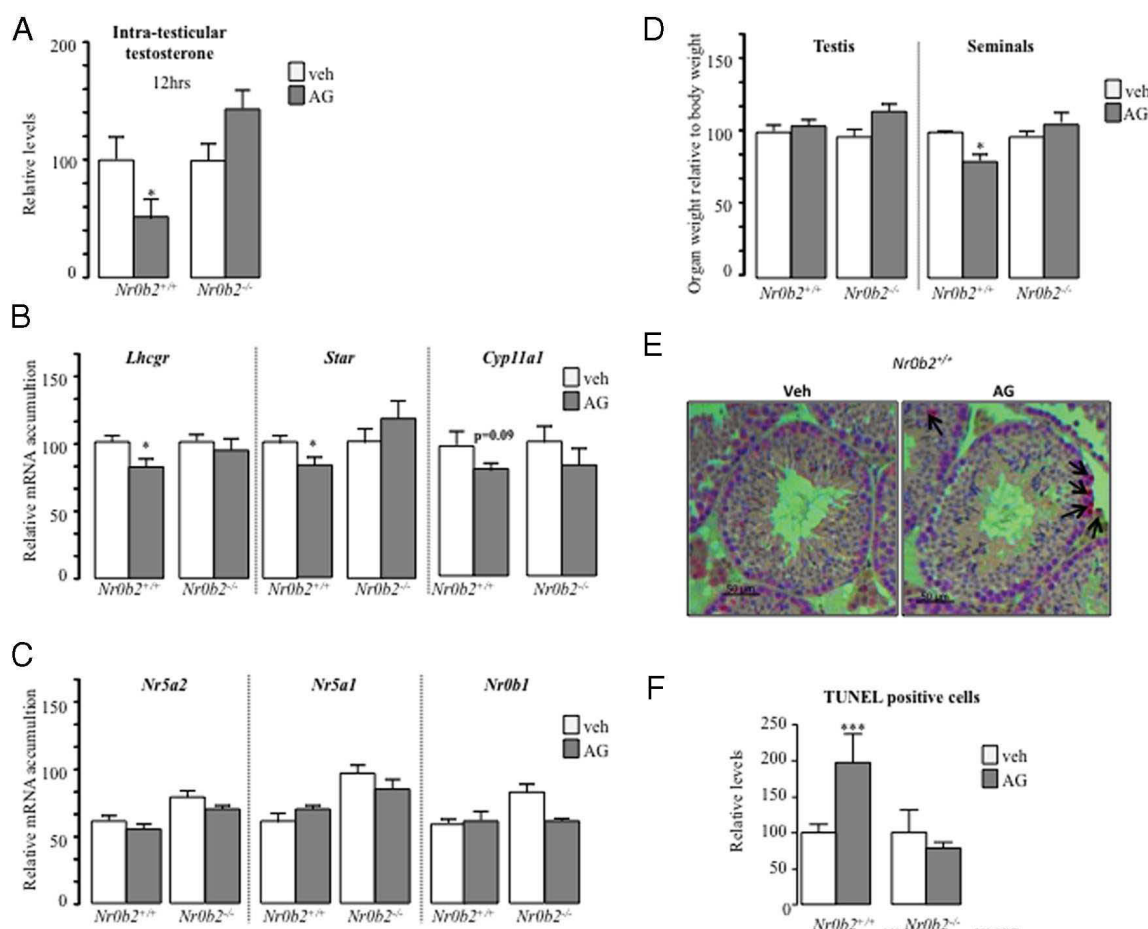
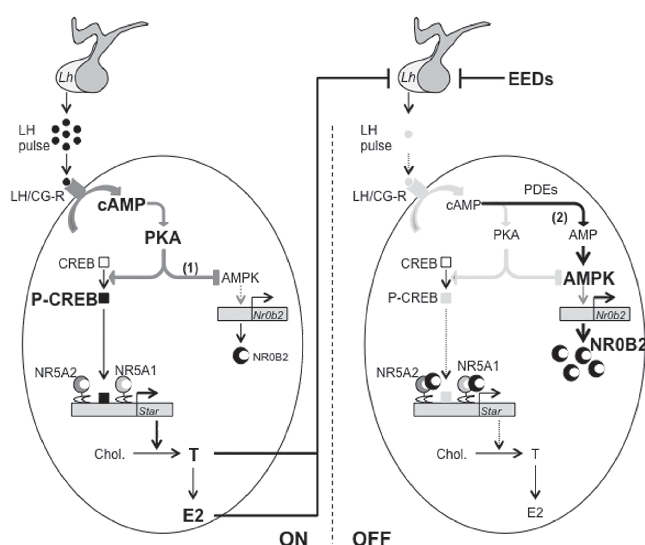


Figure 6. *Nr0b2* deficiency protects testis from deleterious effect of an anti-GnRH exposure. A, Relative intratesticular T concentration in *Nr0b2*^{+/+} and *Nr0b2*^{-/-} mice treated for 12 hours with vehicle of AG (10 mg/kg), (n = 5–10 per group). Vehicle-treated mice of each genotype were arbitrarily fixed at 100%. B, Testicular mRNA expression of *Lhcgr*, *Star* and *Cyp11a1* normalized *36b4* levels in whole testis of *Nr0b2*^{+/+} and *Nr0b2*^{-/-} mice exposed to AG (10 mg/kg · d); n = 5–10 per group. Vehicle-treated mice of each genotype were arbitrarily fixed at 100%. C, Testicular mRNA expression of *Nr5a2*, *Nr5a1*, and *Nr0b1* normalized to *36b4* levels in whole testis of *Nr0b2*^{+/+} and *Nr0b2*^{-/-} mice exposed to AG (10 mg/kg · d); n = 5–10 per group. Vehicle-treated mice were arbitrarily fixed at 100%. D, Testis and seminal vesicle weights normalized to body weight in *Nr0b2*^{+/+} and *Nr0b2*^{-/-} mice exposed 3 days with vehicle of AG (10 mg/kg); n = 5–10 per group. Vehicle-treated mice of each genotype were arbitrarily fixed at 100%. E, Apoptosis in *Nr0b2*^{+/+} and *Nr0b2*^{-/-} mice exposed to vehicle or AG (n = 5–10 per group) analyzed by TUNEL staining. Representative micrographs of the testis of *Nr0b2*^{+/+} or *Nr0b2*^{-/-} exposed to vehicle or AG. The arrowheads indicate apoptotic spermatocytes. The original magnification was ×200. F, Quantification of the TUNEL analyses. The number of TUNEL-positive spermatocytes is indicated as the number of positive cells per 100 seminiferous tubules; n = 5–10. Vehicle-treated mice of each genotype were arbitrarily fixed at 100%. In all of the panels, data are expressed as the mean ± SEM. Statistical analysis: *, *P* < .05; **, *P* < .01; ***, *P* < .005.

a negative feedback by decreasing LH secretion. As expected, we show that during that feedback regulation, P-AMPK is increased followed by higher NR0B2 levels. As already described NR0B2 will thus inhibit NR5A1 and NR5A2 transcriptional effects on various steroidogenic genes such as *Star*.

Our data are in line with previous studies showing that the invalidation of AMPK α 1 impacts testicular physiology. AMPK is expressed in several cell types of the testis such as Leydig, Sertoli, and germ cells. In AMPK $^{-/-}$ mice, spermatozoa show defects of mitochondrial activity and morphological defects. In addition, these AMPK $^{-/-}$ males show a hyperandrogeny, associated with altered steroidogenesis. This is due to the increase of cholesterol content, the precursor of steroid synthesis, a higher mRNA accumulation of

steroidogenic genes consistent with a higher level of P-CREB. These results clearly sustain our present study, suggesting the impact of AMPK on steroidogenesis and its cross talk with hCG/cAMP/CREB pathway. In addition, Abdou et al (34) demonstrated that in MA10 cells, the use of AICAR counteracts the effects of Fsk or hCG on steroid production and *Star* expression. These results are clearly those that we are also describing in our article. Consistently, small interference RNA directed against AMPK led to higher sensitivity of MA10 to Fsk regarding steroid synthesis and *Star* expression. Previous studies (34, 29) also demonstrated that the effect of AMPK involved NR5A1/2 sites. Interestingly, as previously discussed in our article, NR0B2 is known to repress these nuclear receptors. Altogether, these results sup-



port our work on the role of NR0B2 in AMPK effects on steroidogenesis.

LH signaling leads to cAMP production and then induction of steroidogenesis. Interestingly, it has been demonstrated that after hCG treatment, phospho-diesterases (PDEs) transform cAMP into AMP, which results in turn to AMPK activation. This induction of AMPK then represses steroidogenesis. This acts as a feedback mechanism to avoid maintenance of high steroid synthesis (Figure 7). In that context, it could be hypothesized that data using cAMP analogs should be analyzed with caution, because they will act in favor to steroidogenesis activation and repression of AMPK activity. In that case, it will be more difficult to visualize the kinetic event of the effects of PDE leading to production of AMP and then activation of AMPK.

Altogether, we hypothesize that the physiological role of NR0B2 might be to decrease the expression of steroidogenic genes in response to the central negative feedback on LH. This might participate to maintain the normal pulsatile secretion of GnRH and gonadotropins and in turn ensure normal testicular physiology.

Paradoxically, *Nr0b2*^{-/-} males present normal level of LH and normal answer to acute LH surge (21). This normal response to LH could be due to the fact that NR0B1,

a “twin” receptor of NR0B2, can overcome its absence. Indeed, NR0B1 is also involved in the regulation of steroidogenesis (7). This potential redundancy is supported by the fact that *Nr0b1* gene shows the same expression pattern than *Nr0b2* in response to hCG (35).

Increase of NR0B2 in condition of low LH might lead to a repression of steroidogenesis. In turn, lower T might be followed by a decrease of negative feedback at HP levels and then might increase the subsequent activity of the HP axis. Thus, it could be speculated that in long-term experiments, there could be a higher T production in *Nr0b2*^{-/-} mice compared with wild-type males. Such hypothesis has to be further studied. However, as discussed, the lack of NR0B2 associated with higher T levels was not associated with changes in the HP axis activity. This suggests that other factors might be involved. The lack of association between plasma T and LH levels has been observed in several other studies (36, 37). In all these cases, estrogen levels should be measured, because they are more potent inhibitors of the HP axis than T. Altogether, these data confirm that the relation between the levels of sex steroids and HP axis is complicated. Our results also open a new field of investigation. Indeed, hypogonadotropic hypogonadism accounts for up to 2% of infertile men. Even though it can be successfully treated (38), our results suggest that NR0B2 could be a new potential pharmacological target in such disease. Alterations of the HP axis could be due either to genetic mutation or exposure to endocrine disrupters (Figure 7). Indeed, if EB exposure has been associated with low LH/CG plasma levels and low T synthesis (39), *Nr0b2*^{-/-} males do not show reduced T levels in response to EB exposure (22). This clearly suggests that NR0B2 might be a mediator of low LH signaling within Leydig cells in case of EED exposure.

Even though a full understanding of the mechanisms requires further studies, our work sustained the idea that AMPK might be an important actor of Leydig cell physiology as proposed by others (29). Moreover, we describe a critical role of NR0B2 in Leydig cell functions and define it as a testicular messenger of the HP axis signaling in case of low LH levels.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr David H., PhD, Génétique Reproduction et Développement, Inserm Unit 1103, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 6293, Clermont Université, 24 Avenue des Landais, Boîte postale 80026, F-63170 Aubière Cedex, France. E-mail: david.volle@inserm.fr; or Professor Jean-Marc A. Lobaccaro, PhD. E-mail: j-marc.lobaccaro@univ-bpclermont.fr.

This work was supported by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.B.), Swiss National Science Foundation (K.S.), Ligue Contre le Cancer (Comité Puy de Dôme) (D.H.V.), the Nouveau Chercheur Auvergne Grant R12087CC (to D.H.V.), and the ANR Jeune Chercheur Grant 1103 (to D.H.V.).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- This work was supported by Inserm, CNRS, Clermont Université, Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (M.B.), Swiss National Science Foundation (K.S.), Ligue Contre le Cancer (Comité Puy de Dôme) (D.H.V.), the Nouveau Chercheur Auvergne Grant R12087CC (to D.H.V.), and the ANR Jeune Chercheur Grant 1103 (to D.H.V.).
- Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.
- ## References
1. Wilson JD, Leihy MW, Shaw G, Renfree MB. Androgen physiology: unsolved problems at the millennium. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;198(1-2):1-5.
 2. Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*. 2009;30(2):119-132.
 3. Woolveridge I, Bryden AA, Taylor MF, George NJ, Wu FC, Morris ID. Apoptosis and expression of apoptotic regulators in the human testis following short- and long-term anti-androgen treatment. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(7):701-707.
 4. Stocco DM. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol*. 2000;164(3):247-253.
 5. Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, et al. Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids*. 1997;62(1):21-28.
 6. Hu M-C, Hsu H-J, Guo I-C, Chung B-C. Function of Cyp11a1 in animal models. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;215(1-2):95-100.
 7. Maqdasy S, Baptissart M, Vega A, Baron S, Lobaccaro J-MA, Volle DH. Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368(1-2):30-46.
 8. Stocco DM, Khan SA. Effects of steroidogenesis inducing protein (SIP) on steroid production in MA-10 mouse Leydig tumor cells: utilization of a non-cAMP second messenger pathway. *Mol Cell Endocrinol*. 1992;84(3):185-194.
 9. Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol*. 1988;50:427-440.
 10. Bakke M, Zhao L, Hanley NA, Parker KL. SF-1: a critical mediator of steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;171(1-2):5-7.
 11. Meeks JJ, Russell TA, Jeffs B, Huhtaniemi I, Weiss J, Jameson JL. Leydig cell-specific expression of DAX1 improves fertility of the Dax1-deficient mouse. *Biol Reprod*. 2003;69(1):154-160.
 12. Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, et al. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1902-1912.
 13. Volle DH, Mouzat K, Duggavathi R, et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. *Mol Endocrinol*. 2007;21(5):1014-1027.
 14. Kuhl AJ, Ross SM, Gaido KW. CCAAT/enhancer binding protein β , but not steroidogenic factor-1, modulates the phthalate-induced dysregulation of rat fetal testicular steroidogenesis. *Endocrinology*. 2007;148(12):5851-5864.
 15. Kim JW, Peng N, Rainey WE, Carr BR, Attia GR. Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):3042-3047.
 16. Martin LJ, Boucher N, Brousseau C, Tremblay JJ. The orphan nuclear receptor NUR77 regulates hormone-induced StAR transcription in Leydig cells through cooperation with Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase I. *Mol Endocrinol*. 2008;22(9):2021-2037.
 17. Manna PR, Dyson MT, Eubank DW, et al. Regulation of steroidogenesis and the steroidogenic acute regulatory protein by a member of the cAMP response-element binding protein family. *Mol Endocrinol*. 2002;16(1):184-199.
 18. Seol W, Choi HS, Moore DD. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. *Science*. 1996;272(5266):1336-1339.
 19. Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell*. 2000;6(3):517-526.
 20. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell*. 2000;6(3):507-515.
 21. Volle DH, Duggavathi R, Magnier BC, et al. The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev*. 2007;21(3):303-315.
 22. Volle DH, Decourteix M, Garo E, et al. The orphan nuclear receptor small heterodimer partner mediates male infertility induced by diethylstilbestrol in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3752-3764.
 23. Dalterio S, Bartke A, Steger R, Mayfield D. Neonatal exposure to DES in BALB/c male mice: effects on pituitary-gonadal function. *Pharmacol Biochem Behav*. 1985;22(6):1019-1024.
 24. Baptissart M, Vega A, Martinot E, et al. Bile acids alter male fertility through G-protein-coupled bile acid receptor 1 signaling pathways in mice. *Hepatology*. 2014;60(3):1054-1065.
 25. Oumeddour A, Viennois E, Caira F, et al. Liver X receptors interfere with the deleterious effect of diethylstilbestrol on testicular physiology. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;446(3):656-662.
 26. Baron S, Manin M, Aigueperse C, et al. Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene akr1b7 expression in Leydig cells. *J Mol Endocrinol*. 2003;31(1):71-81.
 27. Oosterveer MH, Matak C, Yamamoto H, et al. LXR-1-dependent glucose sensing determines intermediary metabolism in liver. *J Clin Invest*. 2012;122(8):2817-2826.
 28. Hansson V, Skålhegg BS, Taskén K. Cyclic-AMP-dependent protein kinase (PKA) in testicular cells. Cell specific expression, differential regulation and targeting of subunits of PKA. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2000;73(1-2):81-92.
 29. Ahn SW, Gang GT, Tadi S, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase are required for steroidogenesis in testicular Leydig cells. *J Biol Chem*. 2012;287(50):41875-41887.
 30. Kim YD, Park KG, Lee YS, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes*. 2008;57(2):306-314.
 31. Tartarin P, Guibert E, Touré A, et al. Inactivation of AMPK α 1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology*. 2012;153(7):3468-3481.
 32. Vega A, Baptissart M, Caira F, Brugnon F, Lobaccaro J-MA, Volle DH. Epigenetic: a molecular link between testicular cancer and environmental exposures. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:150.
 33. Rubin BS. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127(1-2):27-34.
 34. Abdou HS, Bergeron F, Tremblay JJ. A cell autonomous molecular cascade initiated by AMP-activated protein kinase represses steroidogenesis. *Mol Cell Biol*. 2014;34(23):4257-4271.
 35. Song KH, Park YY, Park KC, et al. The atypical orphan nuclear receptor DAX-1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and represses its transactivation. *Mol Endocrinol*. 2004;18(8):1929-1940.
 36. Morgan JA, Cheepala SB, Wang Y, et al. Deregulated hepatic metabolism exacerbates impaired testosterone production in Mrp4-deficient mice. *J Biol Chem*. 2012;287(18):14456-14466.
 37. Ahn SW, Gang GT, Kim YD, et al. Insulin directly regulates steroidogenesis via induction of the orphan nuclear receptor DAX-1 in testicular Leydig cells. *J Biol Chem*. 2013;288(22):15937-15946.
 38. Trussell JC. Male reproductive endocrinology: when to replace gonadotropins. *Semin Reprod Med*. 2013;31(4):237-244.
 39. Tena-Sempere M, Navarro J, Pinilla L, González LC, Huhtaniemi I, Aguilar E. Neonatal exposure to estrogen differentially alters estrogen receptor α and β mRNA expression in rat testis during postnatal development. *J Endocrinol*. 2000;165(2):345-357.

Références bibliographiques

- Achermann, J.C., Meeks, J.J., and Larry Jameson, J. (2001). Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. *Mol. Cell. Endocrinol.* *185*, 17–25.
- Adorini, L., Pruzanski, M., and Shapiro, D. (2012). Farnesoid X receptor targeting to treat nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Discov. Today* *17*, 988–997.
- Adrian, T.E., Ballantyne, G.H., Longo, W.E., Bilchik, A.J., Graham, S., Basson, M.D., Tierney, R.P., and Modlin, I.M. (1993). Deoxycholate is an important releaser of peptide YY and enteroglucagon from the human colon. *Gut* *34*, 1219–1224.
- Ahn, S.W., Gang, G.-T., Kim, Y.D., Ahn, R.-S., Harris, R.A., Lee, C.-H., and Choi, H.-S. (2013). Insulin directly regulates steroidogenesis via induction of the orphan nuclear receptor DAX-1 in testicular Leydig cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 15937–15946.
- Akingbemi, B.T., Ge, R., Rosenfeld, C.S., Newton, L.G., Hardy, D.O., Catterall, J.F., Lubahn, D.B., Korach, K.S., and Hardy, M.P. (2003). Estrogen receptor- α gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinology* *144*, 84–93.
- Akita, H., Suzuki, H., Ito, K., Kinoshita, S., Sato, N., Takikawa, H., and Sugiyama, Y. (2001). Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim. Biophys. Acta* *1511*, 7–16.
- Alnouti, Y. (2009). Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* *108*, 225–246.
- Amé, J.-C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *26*, 882–893.
- Anakk, S., Watanabe, M., Ochsner, S.A., McKenna, N.J., Finegold, M.J., and Moore, D.D. (2011). Combined deletion of Fxr and Shp in mice induces Cyp17a1 and results in juvenile onset cholestasis. *J. Clin. Invest.* *121*, 86–95.
- Angulo, C., Rauch, M.C., Droppelmann, A., Reyes, A.M., Slebe, J.C., Delgado-López, F., Guaiquil, V.H., Vera, J.C., and Concha, I.I. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa: cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell. Biochem.* *71*, 189–203.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., and Skinner, M.K. (2005). Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* *308*, 1466–1469.
- Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* *502*, 462–471.
- Aravin, A.A., and Bourc'his, D. (2008). Small RNA guides for de novo DNA methylation in mammalian germ cells. *Genes Dev.* *22*, 970–975.
- Ariel, M., McCarrey, J., and Cedar, H. (1991). Methylation patterns of testis-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 2317–2321.
- Arpanahi, A., Brinkworth, M., Iles, D., Krawetz, S.A., Paradowska, A., Platts, A.E., Saida, M., Steger, K., Tedder, P., and Miller, D. (2009). Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Res.* *19*, 1338–1349.

- Augustine, L.M., Markelewicz, R.J., Boekelheide, K., and Cherrington, N.J. (2005). Xenobiotic and Endobiotic Transporter Mrna Expression in the Blood-Testis Barrier. *Drug Metab. Dispos.* 33, 182–189.
- Banisch, T.U., Goudarzi, M., and Raz, E. (2012). Small RNAs in germ cell development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 99, 79–113.
- Baptissart, M., Vega, A., Maqdasy, S., Caira, F., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., and Volle, D.H. (2013a). Bile acids: From digestion to cancers. *Biochimie* 95, 504–517.
- Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., and Volle, D.H. (2013b). Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 4511–4526.
- Baptissart, M., Vega, A., Martinot, E., Pommier, A.J., Houten, S.M., Marceau, G., de Haze, A., Baron, S., Schoonjans, K., Lobaccaro, J.-M.A., et al. (2014). Bile acids alter male fertility through TGR5 signaling pathways. *Hepatology* n/a – n/a.
- Barbier, O., Torra, I.P., Sirvent, A., Claudel, T., Blanquart, C., Duran-Sandoval, D., Kuipers, F., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., and Staels, B. (2003). FXR induces the UGT2B4 enzyme in hepatocytes: a potential mechanism of negative feedback control of FXR activity. *Gastroenterology* 124, 1926–1940.
- Barlow, D.P. (2011). Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu. Rev. Genet.* 45, 379–403.
- Barreau, C., Benson, E., Gudmannsdottir, E., Newton, F., and White-Cooper, H. (2008). Post-meiotic transcription in *Drosophila* testes. *Dev. Camb. Engl.* 135, 1897–1902.
- Bassett, J.H., O'Halloran, D.J., Williams, G.R., Beardwell, C.G., Shalet, S.M., and Thakker, R.V. (1999). Novel DAX1 mutations in X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotrophic hypogonadism. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 50, 69–75.
- Baumgartner, U., Schölmerich, J., Kremer, B., Streckfuss, G., Henne-Bruns, D., Mergard, B.L., Kraemer-Hansen, H., and Farthmann, E.H. (1995). Early detection of graft dysfunction after orthotopic liver transplantation in man by serum and biliary bile acid analysis. *Hepatogastroenterology* 42, 950–960.
- Bedford, J.M. (1970). Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol. Reprod. Suppl.* 2, 128–158.
- Benzimra, J., Derhy, S., Rosmorduc, O., Menu, Y., Poupon, R., and Arrivé, L. (2013). Hepatobiliary anomalies associated with ABCB4/MDR3 deficiency in adults: a pictorial essay. *Insights Imaging* 4, 331–338.
- Berkovits, B.D., and Wolgemuth, D.J. (2011). The first bromodomain of the testis-specific double bromodomain protein Brdt is required for chromocenter organization that is modulated by genetic background. *Dev. Biol.* 360, 358–368.
- Bernard, O. (1995). [Plea for early diagnosis of biliary tract atresia. Twelve errors to avoid]. *Arch. Pédiatrie Organe Off. Société Fr. Pédiatrie* 2, 937–939.

- Berta, P., Hawkins, J.R., Sinclair, A.H., Taylor, A., Griffiths, B.L., Goodfellow, P.N., and Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448–450.
- Billig, H., Furuta, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., and Hsueh, A.J. (1995). Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136, 5–12.
- Blachier, M., Leleu, H., Peck-Radosavljevic, M., Valla, D.-C., and Roudot-Thoraval, F. (2013). The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J. Hepatol.* 58, 593–608.
- Blanco-Rodríguez, J., and Martínez-García, C. (1999). Apoptosis is physiologically restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Biol. Reprod.* 61, 1541–1547.
- Blanco-Rodriguez, J., Martinez-Garcia, C., and Porras, A. (2003). Correlation between DNA synthesis in the second, third and fourth generations of spermatogonia and the occurrence of apoptosis in both spermatogonia and spermatocytes. *Reproduction* 126, 661–668.
- Blok, L., Mackenbach, P., Trapman, J., Themmen, A., Brinkmann, A., and Grootegoed, J. (1989). Follicle-Stimulating-Hormone Regulates Androgen Receptor Messenger-Rna. *Mol. Cell. Endocrinol.* 63, 267–271.
- Bodin, K., Lindbom, U., and Diczfalusy, U. (2005). Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4. *Biochim. Biophys. Acta* 1687, 84–93.
- Boissonnas, C.C., Abdalaoui, H.E., Haelewyn, V., Fauque, P., Dupont, J.M., Gut, I., Vaiman, D., Jouannet, P., Tost, J., and Jammes, H. (2010). Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 18, 73–80.
- Bonfrate, L., Wang, D.Q.-H., Garruti, G., and Portincasa, P. (2014). Obesity and the risk and prognosis of gallstone disease and pancreatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 623–635.
- Boockfor, F.R., and Schwarz, L.K. (1991). Effects of interleukin-6, interleukin-2, and tumor necrosis factor alpha on transferrin release from Sertoli cells in culture. *Endocrinology* 129, 256–262.
- Borgius, L.J., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-A., and Treuter, E. (2002). Glucocorticoid signaling is perturbed by the atypical orphan receptor and corepressor SHP. *J. Biol. Chem.* 277, 49761–49766.
- Bornstein, S.R., Rutkowski, H., and Vrezas, I. (2004). Cytokines and steroidogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 135–141.
- Bose, H.S., Sugawara, T., Strauss, J.F., Miller, W.L., and International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium (1996). The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* 335, 1870–1878.
- Botla, R., Spivey, J.R., Aguilar, H., Bronk, S.F., and Gores, G.J. (1995). Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 930–938.
- Bourc'his, D., and Bestor, T.H. (2004). Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431, 96–99.

- Boussouar, F., Grataroli, R., Ji, J., and Benahmed, M. (1999). Tumor necrosis factor- α stimulates lactate dehydrogenase A expression in porcine cultured sertoli cells: mechanisms of action. *Endocrinology* 140, 3054–3062.
- Bowers, L.D., and Sanaullah, null (1996). Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 687, 61–68.
- Bowles, J., Knight, D., Smith, C., Wilhelm, D., Richman, J., Mamiya, S., Yashiro, K., Chawengsaksohak, K., Wilson, M.J., Rossant, J., et al. (2006). Retinoid Signaling Determines Germ Cell Fate in Mice. *Science* 312, 596–600.
- Braun, R.E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* 28, 10–12.
- Brehm, R., Marks, A., Rey, R., Kliesch, S., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Altered expression of connexins 26 and 43 in Sertoli cells in seminiferous tubules infiltrated with carcinoma-in-situ or seminoma. *J. Pathol.* 197, 647–653.
- Bricault, I. (2013). Biliary obstruction: Not always simple! *Diagn. Interv. Imaging* 94, 729–740.
- Brinster, R.L., and Avarbock, M.R. (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11303–11307.
- Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 11298–11302.
- Brites, D., Rodrigues, C.M., van-Zeller, H., Brito, A., and Silva, R. (1998). Relevance of serum bile acid profile in the diagnosis of intrahepatic cholestasis of pregnancy in an high incidence area: Portugal. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 80, 31–38.
- Brown, C.R., Glos, K.I. von, and Jones, R. (1983). Changes in plasma membrane glycoproteins of rat spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Cell Biol.* 96, 256–264.
- De Bruyne, R., Van Biervliet, S., Vande Velde, S., and Van Winckel, M. (2011). Clinical practice: neonatal cholestasis. *Eur. J. Pediatr.* 170, 279–284.
- Bruzzzone, R., White, T.W., and Goodenough, D.A. (1996). The cellular Internet: on-line with connexins. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 18, 709–718.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schübeler, D., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2010). Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 679–687.
- Bulle, F., Mavrier, P., Zafrani, E.S., Preaux, A.M., Lescs, M.C., Siegrist, S., Dhumeaux, D., and Guellaën, G. (1990). Mechanism of gamma-glutamyl transpeptidase release in serum during intrahepatic and extrahepatic cholestasis in the rat: a histochemical, biochemical and molecular approach. *Hepatology* 11, 545–550.
- Caiafa, P., Guastafierro, T., and Zampieri, M. (2009). Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns. *FASEB J.* 23, 672–678.

- Campana, G., Pasini, P., Roda, A., and Spampinato, S. (2005). Regulation of ileal bile acid-binding protein expression in Caco-2 cells by ursodeoxycholic acid: role of the farnesoid X receptor. *Biochem. Pharmacol.* 69, 1755–1763.
- Cao, X.-W., Lin, K., Li, C.-Y., and Yuan, C.-W. (2011). [A review of WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (5th edition)]. *Zhonghua Nan Ke Xue Natl. J. Androl.* 17, 1059–1063.
- Carette, D., Weider, K., Gilleron, J., Giese, S., Dompierre, J., Bergmann, M., Brehm, R., Denizot, J.-P., Segretain, D., and Pointis, G. (2010). Major involvement of connexin 43 in seminiferous epithelial junction dynamics and male fertility. *Dev. Biol.* 346, 54–67.
- Cariou, B., van Harmelen, K., Duran-Sandoval, D., van Dijk, T.H., Grefhorst, A., Abdelkarim, M., Caron, S., Torpier, G., Fruchart, J.-C., Gonzalez, F.J., et al. (2006). The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J. Biol. Chem.* 281, 11039–11049.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J.G., Bourc’his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. (2007). MIWI2 Is Essential for Spermatogenesis and Repression of Transposons in the Mouse Male Germline. *Dev. Cell* 12, 503–514.
- Caron, K.M., Clark, B.J., Ikeda, Y., and Parker, K.L. (1997). Steroidogenic factor 1 acts at all levels of the reproductive axis. *Steroids* 62, 53–56.
- Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., et al. (2010). Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals. *Cell* 143, 1084–1096.
- Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., and Levallet, J. (1999). Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J. Androl.* 22, 211–223.
- Carreau, S., Bouraima-Lelong, H., and Delalande, C. (2012). Estrogen, a female hormone involved in spermatogenesis. *Adv. Med. Sci.* 57, 31–36.
- Carrell, D.T., Emery, B.R., and Hammoud, S. (2007). Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum. Reprod. Update* 13, 313–327.
- Carter, B.A., Taylor, O.A., Prendergast, D.R., Zimmerman, T.L., Von Furstenberg, R., Moore, D.D., and Karpen, S.J. (2007). Stigmasterol, a Soy Lipid-Derived Phytosterol, Is an Antagonist of the Bile Acid Nuclear Receptor FXR. *Pediatr. Res.* 62, 301–306.
- Carvalho, E., Liu, C., Shivakumar, P., Sabla, G., Aronow, B., and Bezerra, J.A. (2005). Analysis of the biliary transcriptome in experimental biliary atresia. *Gastroenterology* 129, 713–717.
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Hakimi, P., Xu, C., Massillon, D., Hanson, R.W., et al. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J. Biol. Chem.* 280, 33873–33884.
- Castilla-Cortázar, I., García-Fernández, M., Díaz-Sánchez, M., Castilla, A., Díaz-Casares, A., Varela-Nieto, I., and González-Barón, S. (2004). Hematotesticular barrier is altered from early stages of liver cirrhosis: Effect of insulin-like growth factor 1.

- Catalano, S., Malivindi, R., Giordano, C., Gu, G., Panza, S., Bonofiglio, D., Lanzino, M., Sisci, D., Panno, M.L., and Andò, S. (2010). Farnesoid X receptor, through the binding with steroidogenic factor 1-responsive element, inhibits aromatase expression in tumor Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 285, 5581–5593.
- Chakraborty, P., William Buaas, F., Sharma, M., Smith, B.E., Greenlee, A.R., Eacker, S.M., and Braun, R.E. (2014). Androgen-Dependent Sertoli Cell Tight Junction Remodeling Is Mediated by Multiple Tight Junction Components. *Mol. Endocrinol.* 28, 1055–1072.
- Chan, F., Oatley, M.J., Kaucher, A.V., Yang, Q.-E., Bieberich, C.J., Shashikant, C.S., and Oatley, J.M. (2014). Functional and molecular features of the Id4+ germline stem cell population in mouse testes. *Genes Dev.* 28, 1351–1362.
- Chang, C., Lee, S.O., Wang, R.-S., Yeh, S., and Chang, T.-M. (2013). Androgen receptor (AR) physiological roles in male and female reproductive systems: lessons learned from AR-knockout mice lacking AR in selective cells. *Biol. Reprod.* 89, 21.
- Chang, Y.-F., Lee-Chang, J.S., Harris, K.Y., Sinha-Hikim, A.P., and Rao, M.K. (2011). Role of β -Catenin in Post-Meiotic Male Germ Cell Differentiation. *PLoS ONE* 6, e28039.
- Chang, Y.-F., Lee-Chang, J.S., Imam, J.S., Buddavarapu, K.C., Subaran, S.S., Sinha-Hikim, A.P., Gorospe, M., and Rao, M.K. (2012). Interaction between microRNAs and actin-associated protein Arpc5 regulates translational suppression during male germ cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5750–5755.
- Chau, Y.M., Crawford, P.A., Woodson, K.G., Polish, J.A., Olson, L.M., and Sadovsky, Y. (1997). Role of steroidogenic-factor 1 in basal and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated regulation of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the mouse. *Biol. Reprod.* 57, 765–771.
- Chedin, F., Lieber, M.R., and Hsieh, C.-L. (2002). The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16916–16921.
- Chen, T., and Li, E. (2006). Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 301, 179–201.
- Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 6, 380–395.
- Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2011). Regulation of spermiogenesis, spermiation and blood-testis barrier dynamics: novel insights from studies on Eps8 and Arp3. *Biochem. J.* 435, 553–562.
- Cheng, C.Y., Wong, E.W.P., Yan, H.H.N., and Mruk, D.D. (2010). Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315, 49–56.
- Cheng, J., Watkins, S.C., and Walker, W.H. (2007). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase via Src kinase and the epidermal growth factor receptor in sertoli cells. *Endocrinology* 148, 2066–2074.
- Chevallier, D., Carette, D., Segretain, D., Gilleron, J., and Pointis, G. (2013). Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1207–1220.

Chiang, J.Y.L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *J. Lipid Res.* 50, 1955–1966.

Chihara, M., Otsuka, S., Ichii, O., and Kon, Y. (2013). Vitamin A Deprivation Affects the Progression of the Spermatogenic Wave and Initial Formation of the Blood-testis Barrier, Resulting in Irreversible Testicular Degeneration in Mice. *J. Reprod. Dev.* 59, 525–535.

Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Andò, S., Maggiolini, M., Carreau, S., and Pezzi, V. (2010). 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol. Cell. Endocrinol.* 320, 136–144.

Chimento, A., Sirianni, R., Zolea, F., Bois, C., Delalande, C., Andò, S., Maggiolini, M., Aquila, S., Carreau, S., and Pezzi, V. (2011). Gper and ESRs are expressed in rat round spermatids and mediate oestrogen-dependent rapid pathways modulating expression of cyclin B1 and Bax. *Int. J. Androl.* 34, 420–429.

Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., Ruggiero, C., Maggiolini, M., Andò, S., and Pezzi, V. (2012). 17 β -Estradiol activates GPER- and ESR1-dependent pathways inducing apoptosis in GC-2 cells, a mouse spermatocyte-derived cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* 355, 49–59.

Cho, C., Willis, W.D., Goulding, E.H., Jung-Ha, H., Choi, Y.C., Hecht, N.B., and Eddy, E.M. (2001). Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat. Genet.* 28, 82–86.

Ciccone, D.N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E., and Chen, T. (2009). KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 461, 415–418.

Cipriani, S., Mencarelli, A., Chini, M.G., Distrutti, E., Renga, B., Bifulco, G., Baldelli, F., Donini, A., and Fiorucci, S. (2011). The bile acid receptor GPBAR-1 (TGR5) modulates integrity of intestinal barrier and immune response to experimental colitis. *PloS One* 6, e25637.

Clark, B.J., and Stocco, D.M. (1995). Expression of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein: a novel LH-induced mitochondrial protein required for the acute regulation of steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. *Endocr. Res.* 21, 243–257.

Claudel, T., Sturm, E., Duez, H., Torra, I.P., Sirvent, A., Kosykh, V., Fruchart, J.-C., Dallongeville, J., Hum, D.W., Kuipers, F., et al. (2002). Bile acid-activated nuclear receptor FXR suppresses apolipoprotein A-I transcription via a negative FXR response element. *J. Clin. Invest.* 109, 961–971.

Claudel, T., Staels, B., and Kuipers, F. (2005). The Farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2020–2030.

Clayton MD, F., Peter Theodore, Whitfield BSC, P., and Iyer FRCS, K. (1998). The Role of Phytosterols in the Pathogenesis of Liver Complications of Pediatric Parenteral Nutrition. *Nutrition* 14, 158–164.

Clermont, Y., and Perey, B. (1957). Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am. J. Anat.* 100, 241–267.

Conley, A.J., and Bird, I.M. (1997). The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol. Reprod.* 56, 789–799.

- Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.A., and Korach, K.S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology* 138, 4613–4621.
- Craddock, A.L., Love, M.W., Daniel, R.W., Kirby, L.C., Walters, H.C., Wong, M.H., and Dawson, P.A. (1998). Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am. J. Physiol.* 274, G157–G169.
- Crestani, M., Sadeghpour, A., Stroup, D., Galli, G., and Chiang, J.Y.L. (1998). Transcriptional activation of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A) by nuclear hormone receptors. *J. Lipid Res.* 39, 2192–2200.
- David Josephy, P., Peter Guengerich, F., and Miners, J.O. (2005). “Phase I and Phase II” drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab. Rev.* 37, 575–580.
- Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C., and Jacquemin, E. (2009). Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J. Rare Dis.* 4, 1.
- Davit-Spraul, A., Fabre, M., Branchereau, S., Baussan, C., Gonzales, E., Stieger, B., Bernard, O., and Jacquemin, E. (2010). ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): Phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 51, 1645–1655.
- Dawson, P.A., Lan, T., and Rao, A. (2009). Bile acid transporters. *J. Lipid Res.* 50, 2340–2357.
- De, S.K., Chen, H.L., Pace, J.L., Hunt, J.S., Terranova, P.F., and Enders, G.C. (1993). Expression of tumor necrosis factor- α in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133, 389–396.
- Degirolamo, C., Modica, S., Vacca, M., Di Tullio, G., Morgano, A., D’Orazio, A., Kannisto, K., Parini, P., and Moschetta, A. (2014). Prevention of spontaneous hepatocarcinogenesis in FXR null mice by intestinal specific FXR re-activation. *Hepatol. Baltim. Md.*
- Delbès, G., Levacher, C., Duquenne, C., Racine, C., Pakarinen, P., and Habert, R. (2005). Endogenous estrogens inhibit mouse fetal Leydig cell development via estrogen receptor α . *Endocrinology* 146, 2454–2461.
- Deng, W., and Lin, H. (2002). miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev. Cell* 2, 819–830.
- Denolet, E., De Gendt, K., Allemeersch, J., Engelen, K., Marchal, K., Van Hummelen, P., Tan, K.A.L., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., Swinnen, J.V., et al. (2006). The effect of a sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor on testicular gene expression in prepubertal mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 20, 321–334.
- Denson, L.A., Sturm, E., Echevarria, W., Zimmerman, T.L., Makishima, M., Mangelsdorf, D.J., and Karpen, S.J. (2001). The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology* 121, 140–147.
- Dermietzel, R., Hwang, T.K., and Spray, D.S. (1990). The gap junction family: structure, function and chemistry. *Anat. Embryol. (Berl.)* 182, 517–528.

- Dhar, S., Thota, A., and Rao, M.R.S. (2012). Insights into role of bromodomain, testis-specific (Brdt) in acetylated histone H4-dependent chromatin remodeling in mammalian spermiogenesis. *J. Biol. Chem.* 287, 6387–6405.
- Dhayalan, A., Rajavelu, A., Rathert, P., Tamas, R., Jurkowska, R.Z., Ragozin, S., and Jeltsch, A. (2010). The Dnmt3a PWWP domain reads histone 3 lysine 36 trimethylation and guides DNA methylation. *J. Biol. Chem.* 285, 26114–26120.
- Dierich, A., Sairam, M.R., Monaco, L., Fimia, G.M., Gansmuller, A., LeMeur, M., and Sassone-Corsi, P. (1998). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13612–13617.
- Dietrich, P., and Hellerbrand, C. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 637–653.
- Dix, D.J., Allen, J.W., Collins, B.W., Mori, C., Nakamura, N., Poorman-Allen, P., Goulding, E.H., and Eddy, E.M. (1996). Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 3264–3268.
- Dorrington, J.H., Fritz, I.B., and Armstrong, D.T. (1978). Control of testicular estrogen synthesis. *Biol. Reprod.* 18, 55–64.
- Downes, M., Verdecia, M.A., Roecker, A.J., Hughes, R., Hogenesch, J.B., Kast-Woelbern, H.R., Bowman, M.E., Ferrer, J.-L., Anisfeld, A.M., Edwards, P.A., et al. (2003). A chemical, genetic, and structural analysis of the nuclear bile acid receptor FXR. *Mol. Cell* 11, 1079–1092.
- Doyen, C.M., Moshkin, Y.M., Chalkley, G.E., Bezstarosti, K., Demmers, J.A.A., Rathke, C., Renkawitz-Pohl, R., and Verrijzer, C.P. (2013). Subunits of the histone chaperone CAF1 also mediate assembly of protamine-based chromatin. *Cell Rep.* 4, 59–65.
- Du, M., Young, J., De Asis, M., Cipollone, J., Roskelley, C., Takai, Y., Nicholls, P.K., Stanton, P.G., Deng, W., Finlay, B.B., et al. (2013). A novel subcellular machine contributes to basal junction remodeling in the seminiferous epithelium. *Biol. Reprod.* 88, 60.
- Duane, W.C., and Javitt, N.B. (1999). 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *J. Lipid Res.* 40, 1194–1199.
- Dufau, M.L. (1998). The Luteinizing Hormone Receptor1. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 461–496.
- Dupont, S., Krust, A., Gansmuller, A., Dierich, A., Chambon, P., and Mark, M. (2000). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127, 4277–4291.
- Durazzo, M., Premoli, A., Di Bisceglie, C., Bertagna, A., Faga, E., Biroli, G., Manieri, C., Bo, S., and Pagano, G. (2006). Alterations of seminal and hormonal parameters: An extrahepatic manifestation of HCV infection? *World J. Gastroenterol. WJG* 12, 3073–3076.
- Durmaz, E., Turkkahraman, D., Berdeli, A., Atan, M., Karaguzel, G., Akcurin, S., and Bircan, I. (2013). A novel DAX-1 mutation presented with precocious puberty and hypogonadotropic hypogonadism in different members of a large pedigree. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 26, 551–555.

- Dym, M., and Cavicchia, J.C. (1978). Functional Morphology of the Testis. *Biol. Reprod.* 18, 1–15.
- Eacker, S.M., Agrawal, N., Qian, K., Dichek, H.L., Gong, E.-Y., Lee, K., and Braun, R.E. (2008). Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 623–635.
- Eddy, E.M., Washburn, T.F., Bunch, D.O., Goulding, E.H., Gladen, B.C., Lubahn, D.B., and Korach, K.S. (1996). Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology* 137, 4796–4805.
- Elliott, M.R., Zheng, S., Park, D., Woodson, R.I., Reardon, M.A., Juncadella, I.J., Kinchen, J.M., Zhang, J., Lysiak, J.J., and Ravichandran, K.S. (2010). Unexpected requirement for ELMO1 in clearance of apoptotic germ cells in vivo. *Nature* 467, 333–337.
- Elshal, M.F., El-Sayed, I.H., Elsaied, M.A., El-Masry, S.A., and Kumosani, T.A. (2009). Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin. Biochem.* 42, 589–594.
- Erkek, S., Hisano, M., Liang, C.-Y., Gill, M., Murr, R., Dieker, J., Schübeler, D., van der Vlag, J., Stadler, M.B., and Peters, A.H.F.M. (2013). Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1236–1236.
- European Association for the Study of the Liver (2009). EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases. *J. Hepatol.* 51, 237–267.
- Falany, C.N., Johnson, M.R., Barnes, S., and Diasio, R.B. (1994). Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA:amino acid N-acyltransferase. *J. Biol. Chem.* 269, 19375–19379.
- Faraone-Mennella, M.R., De Lucia, F., Gentile, N., Quesada, P., and Farina, B. (1999). In vitro poly(ADP-ribosyl)ated histones H1a and H1t modulate rat testis chromatin condensation differently. *J. Cell. Biochem.* 76, 20–29.
- Fatemi, M., Hermann, A., Gowher, H., and Jeltsch, A. (2002). Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur. J. Biochem. FEBS* 269, 4981–4984.
- Faubion, W.A., Guicciardi, M.E., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Roberts, P.J., Svingen, P.A., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. (1999). Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J. Clin. Invest.* 103, 137–145.
- Fechner, A., Fong, S., and McGovern, P. (2008). A review of Kallmann syndrome: genetics, pathophysiology, and clinical management. *Obstet. Gynecol. Surv.* 63, 189–194.
- Feldman, A.G., and Sokol, R.J. (2013). Neonatal Cholestasis. *NeoReviews* 14, e63–e73.
- Feng, S., Yang, M., Zhang, Z., Wang, Z., Hong, D., Richter, H., Benson, G.M., Bleicher, K., Grether, U., Martin, R.E., et al. (2009). Identification of an N-oxide pyridine GW4064 analog as a potent FXR agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19, 2595–2598.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2004). In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* 25, 811–818.

- Feverly, J. (2008). Bilirubin in clinical practice: a review. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* 28, 592–605.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., et al. (2004). Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* 127, 261–274.
- Fijak, M., Bhushan, S., and Meinhardt, A. (2011). Immunoprivileged Sites: The Testis. In *Suppression and Regulation of Immune Responses*, M.C. Cuturi, and I. Anegón, eds. (Humana Press), pp. 459–470.
- Finkelstein, J.S., Klibanski, A., Neer, R.M., Doppelt, S.H., Rosenthal, D.I., Segre, G.V., and Crowley, W.F. (1989). Increases in bone density during treatment of men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69, 776–783.
- Fisher, L., Byrnes, E., and Fisher, A.A. (2009). Prevalence of vitamin K and vitamin D deficiency in patients with hepatobiliary and pancreatic disorders. *Nutr. Res. N. Y.* 29, 676–683.
- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D., and Higgins, M.J. (2002). Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat. Genet.* 32, 426–431.
- Fix, C., Jordan, C., Cano, P., and Walker, W.H. (2004). Testosterone activates mitogen-activated protein kinase and the cAMP response element binding protein transcription factor in Sertoli cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10919–10924.
- Foradori, C.D., Weiser, M.J., and Handa, R.J. (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 169–181.
- Fouquet, V., Alves, A., Branchereau, S., Grabar, S., Debray, D., Jacquemin, E., Devictor, D., Durand, P., Baujard, C., Fabre, M., et al. (2005). Long-term outcome of pediatric liver transplantation for biliary atresia: a 10-year follow-up in a single center. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* 11, 152–160.
- Franchi, E., and Camatini, M. (1985). Evidence that a Ca²⁺ chelator and a calmodulin blocker interfere with the structure of inter-Sertoli junctions. *Tissue Cell* 17, 13–25.
- Fraquelli, M., Losco, A., Visentin, S., Cesana, B.M., Pometta, R., Colli, A., and Conte, D. (2001). Gallstone disease and related risk factors in patients with Crohn disease: analysis of 330 consecutive cases. *Arch. Intern. Med.* 161, 2201–2204.
- Friedman, G.D. (1993). Natural history of asymptomatic and symptomatic gallstones. *Am. J. Surg.* 165, 399–404.
- Fugassa, E., Palmero, S., and Gallo, G. (1987). Triiodothyronine decreases the production of androgen binding protein by rat Sertoli cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 241–247.
- Gadaleta, R.M., van Erpecum, K.J., Oldenburg, B., Willemsen, E.C.L., Renooij, W., Murzilli, S., Klomp, L.W.J., Siersema, P.D., Schipper, M.E.I., Danese, S., et al. (2011). Farnesoid X receptor activation inhibits inflammation and preserves the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *Gut* 60, 463–472.
- Gatewood, J.M., Cook, G.R., Balhorn, R., Bradbury, E.M., and Schmid, C.W. (1987). Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science* 236, 962–964.

- Ge, L.-C., Chen, Z.-J., Liu, H.-Y., Zhang, K.-S., Liu, H., Huang, H.-B., Zhang, G., Wong, C.K.C., Giesy, J.P., Du, J., et al. (2014). Involvement of activating ERK1/2 through G protein coupled receptor 30 and estrogen receptor α/β in low doses of bisphenol A promoting growth of Sertoli TM4 cells. *Toxicol. Lett.* 226, 81–89.
- Geenes, V., and Williamson, C. (2009). Intrahepatic cholestasis of pregnancy. *World J. Gastroenterol.* WJG 15, 2049–2066.
- Geier, A. (2014). Hepatitis B virus: The “metabolovirus” highjacks cholesterol and bile acid metabolism. *Hepatology* n/a – n/a.
- De Gendt, K., and Verhoeven, G. (2012). Tissue- and cell-specific functions of the androgen receptor revealed through conditional knockout models in mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 352, 13–25.
- Gérard, N., Syed, V., and Jégou, B. (1992). Lipopolysaccharide, latex beads and residual bodies are potent activators of Sertoli cell interleukin-1 alpha production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 154–161.
- Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A.F., and Meier, P.J. (1998). The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J. Biol. Chem.* 273, 10046–10050.
- Glantz, A., Marschall, H.-U., and Mattsson, L.-A. (2004). Intrahepatic cholestasis of pregnancy: Relationships between bile acid levels and fetal complication rates. *Hepatol. Baltim. Md* 40, 467–474.
- Gnerre, C., Blättler, S., Kaufmann, M.R., Looser, R., and Meyer, U.A. (2004). Regulation of CYP3A4 by the bile acid receptor FXR: evidence for functional binding sites in the CYP3A4 gene. *Pharmacogenetics* 14, 635–645.
- Godde, J.S. (2009). Dynamic alterations of linker histone variants during development. *Int. J. Dev. Biol.* 53, 215.
- Goharbakhsh, L., Mohazzab, A., Salehkhrou, S., Heidari, M., Zarnani, A.H., Parivar, K., and Akhondi, M.M. (2013). Isolation and culture of human spermatogonial stem cells derived from testis biopsy. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 5, 54–61.
- Goodwin, B., Jones, S.A., Price, R.R., Watson, M.A., McKee, D.D., Moore, L.B., Galardi, C., Wilson, J.G., Lewis, M.C., Roth, M.E., et al. (2000). A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol. Cell* 6, 517–526.
- Gossard, A.A., and Talwalkar, J.A. (2014). Cholestatic Liver Disease. *Med. Clin. North Am.* 98, 73–85.
- Gould, M.L., Hurst, P.R., and Nicholson, H.D. (2007). The effects of oestrogen receptors alpha and beta on testicular cell number and steroidogenesis in mice. *Reprod. Camb. Engl.* 134, 271–279.
- Govin, J., Caron, C., Escoffier, E., Ferro, M., Kuhn, L., Rousseaux, S., Eddy, E.M., Garin, J., and Khochbin, S. (2006). Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* 281, 37888–37892.
- Gowher, H., Stockdale, C.J., Goyal, R., Ferreira, H., Owen-Hughes, T., and Jeltsch, A. (2005). De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 9899–9904.

- Grasso, P., and Reichert, L.E. (1990). Follicle-Stimulating Hormone Receptor-Mediated Uptake of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ by Cultured Rat Sertoli Cells Does Not Require Activation of Cholera Toxin- or Pertussis Toxin-Sensitive Guanine Nucleotide Binding Proteins or Adenylate Cyclase. *Endocrinology* 127, 949–956.
- Greco, T.L., and Payne, A.H. (1994). Ontogeny of expression of the genes for steroidogenic enzymes P450 side-chain cleavage, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase, and P450 aromatase in fetal mouse gonads. *Endocrinology* 135, 262–268.
- Greer, E.L., Maures, T.J., Ucar, D., Hauswirth, A.G., Mancini, E., Lim, J.P., Benayoun, B.A., Shi, Y., and Brunet, A. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 479, 365–371.
- Greer, E.L., Beese-Sims, S.E., Brookes, E., Spadafora, R., Zhu, Y., Rothbart, S.B., Aristizábal-Corrales, D., Chen, S., Badeaux, A.I., Jin, Q., et al. (2014). A histone methylation network regulates transgenerational epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell Rep.* 7, 113–126.
- Gregorio, G.V., Ball, C.S., Mowat, A.P., and Mieli-Vergani, G. (1993). Effect of rifampicin in the treatment of pruritus in hepatic cholestasis. *Arch. Dis. Child.* 69, 141–143.
- Griffiths, L., and Jones, D.E. (2014). Pathogenesis of primary biliary cirrhosis and its fatigue. *Dig. Dis. Basel Switz.* 32, 615–625.
- Grimes, S.R., and Henderson, N. (1984). Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Exp. Cell Res.* 152, 91–97.
- Griswold, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 411–416.
- Gromoll, J., Pekel, E., and Nieschlag, E. (1996). The Structure and Organization of the Human Follicle-Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Gene. *Genomics* 35, 308–311.
- Grove, B.D., and Vogl, A.W. (1989). Sertoli cell ectoplasmic specializations: a type of actin-associated adhesion junction? *J. Cell Sci.* 93, 309–323.
- Guo, G.-Q., and Zheng, G.-C. (2004). Hypotheses for the functions of intercellular bridges in male germ cell development and its cellular mechanisms. *J. Theor. Biol.* 229, 139–146.
- Guo, Y.L., Lambert, G.H., Hsu, C.-C., and Hsu, M.M.L. (2004). Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 153–158.
- Van Haaster, L.H., de Jong, F.H., Docter, R., and de Rooij, D.G. (1993). High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. *Endocrinology* 133, 755–760.
- Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., and Lovell-Badge, R. (1995). Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Dev. Camb. Engl.* 121, 1603–1614.
- Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (1994). Molecular cloning, chromosomal localization, and functional characterization of a human liver Na^{+} /bile acid cotransporter. *J. Clin. Invest.* 93, 1326–1331.

- Hagey, L.R., Crombie, D.L., Espinosa, E., Carey, M.C., Igimi, H., and Hofmann, A.F. (1993). Ursodeoxycholic acid in the Ursidae: biliary bile acids of bears, pandas, and related carnivores. *J. Lipid Res.* *34*, 1911–1917.
- Hales, B.F., Grenier, L., Lalancette, C., and Robaire, B. (2011). Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *91*, 652–665.
- Hammoud, S.S., Purwar, J., Pflueger, C., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2010). Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil. Steril.* *94*, 1728–1733.
- Hammoud, S.S., Nix, D.A., Hammoud, A.O., Gibson, M., Cairns, B.R., and Carrell, D.T. (2011). Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *26*, 2558–2569.
- Hauser, R., and Sokol, R. (2008). Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil. Steril.* *89*, e59–e65.
- Abu-Hayyeh, S., and Williamson, C. (2014). Estradiol, FXR and altered metabolism in pregnancy. *Hepatology* n/a – n/a.
- Van der Heijden, G.W., and Bortvin, A. (2009). Transient relaxation of transposon silencing at the onset of mammalian meiosis. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* *4*, 76–79.
- Helsen, C., and Claessens, F. (2014). Looking at nuclear receptors from a new angle. *Mol. Cell. Endocrinol.* *382*, 97–106.
- Henckel, A., Chebli, K., Kota, S.K., Arnaud, P., and Feil, R. (2012). Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. *EMBO J.* *31*, 606–615.
- Hermann, A., Goyal, R., and Jeltsch, A. (2004). The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J. Biol. Chem.* *279*, 48350–48359.
- Hess, R.A., and Renato de Franca, L. (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv. Exp. Med. Biol.* *636*, 1–15.
- Hi, C., and Jm, B. (1971). Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* *13*, Suppl 13:65–75.
- Higa, L.A., Banks, D., Wu, M., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis in response to DNA damage. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 1675–1680.
- Hoekstra, M., van der Sluis, R.J., Li, Z., Oosterveer, M.H., Groen, A.K., and Van Berkel, T.J.C. (2012). FXR agonist GW4064 increases plasma glucocorticoid levels in C57BL/6 mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* *362*, 69–75.
- Hofmann, A.F. (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* *14*, 24–29.

- Hofny, E.R.M., Ali, M.E.M., Taha, E.A., Nafeh, H.M., Sayed, D.S., Abdel-Azeem, H.G., Abdou, E.F., Kamal, G.M., and Mostafa, T. (2011). Semen and hormonal parameters in men with chronic hepatitis C infection. *Fertil. Steril.* 95, 2557–2559.
- Holt, J.A., Luo, G., Billin, A.N., Bisi, J., McNeill, Y.Y., Kozarsky, K.F., Donahee, M., Wang, D.Y., Mansfield, T.A., Kliewer, S.A., et al. (2003). Definition of a novel growth factor-dependent signal cascade for the suppression of bile acid biosynthesis. *Genes Dev.* 17, 1581–1591.
- Hong, J., Behar, J., Wands, J., Resnick, M., Wang, L.J., DeLellis, R.A., Lambeth, D., Souza, R.F., Spechler, S.J., and Cao, W. (2010). Role of a novel bile acid receptor TGR5 in the development of oesophageal adenocarcinoma. *Gut* 59, 170–180.
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Hotaling, J.M., and Walsh, T.J. (2009). Male infertility: a risk factor for testicular cancer. *Nat. Rev. Urol.* 6, 550–556.
- Hotchkiss, R.D. (1948). THE QUANTITATIVE SEPARATION OF PURINES, PYRIMIDINES, AND NUCLEOSIDES BY PAPER CHROMATOGRAPHY. *J. Biol. Chem.* 175, 315–332.
- Hou, J.W., Collins, D.C., and Schleicher, R.L. (1990). Sources of cholesterol for testosterone biosynthesis in murine Leydig cells. *Endocrinology* 127, 2047–2055.
- Houk, C.P., Pearson, E.J., Martinelle, N., Donahoe, P.K., and Teixeira, J. (2004). Feedback inhibition of steroidogenic acute regulatory protein expression in vitro and in vivo by androgens. *Endocrinology* 145, 1269–1275.
- Hov, J.R., Keitel, V., Laerdahl, J.K., Spomer, L., Ellinghaus, E., ElSharawy, A., Melum, E., Boberg, K.M., Manke, T., Balschun, T., et al. (2010). Mutational characterization of the bile acid receptor TGR5 in primary sclerosing cholangitis. *PloS One* 5, e12403.
- Hsieh, C.-L. (2005). The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC Biochem.* 6, 6.
- Hsu, C.-W., Zhao, J., Huang, R., Hsieh, J.-H., Hamm, J., Chang, X., Houck, K., and Xia, M. (2014). Quantitative High-Throughput Profiling of Environmental Chemicals and Drugs that Modulate Farnesoid X Receptor. *Sci. Rep.* 4.
- Hu, Z., MacLean, J.A., Bhardwaj, A., and Wilkinson, M.F. (2007). Regulation and function of the Rhox5 homeobox gene. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1120, 72–83.
- Huber, R.M., Murphy, K., Miao, B., Link, J.R., Cunningham, M.R., Rupa, M.J., Gunyuzlu, P.L., Haws, T.F., Kassam, A., Powell, F., et al. (2002). Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* 290, 35–43.
- Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 169, 533–557.
- Huhtaniemi, I., Zhang, F.P., Kero, J., Hämäläinen, T., and Poutanen, M. (2002). Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 49–56.

- Humbert, L., Maubert, M.A., Wolf, C., Duboc, H., Mahé, M., Farabos, D., Seksik, P., Mallet, J.M., Trugnan, G., Masliah, J., et al. (2012). Bile acid profiling in human biological samples: Comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J. Chromatogr. B* 899, 135–145.
- Hutchinson, R., Tyrrell, P.N., Kumar, D., Dunn, J.A., Li, J.K., and Allan, R.N. (1994). Pathogenesis of gall stones in Crohn's disease: an alternative explanation. *Gut* 35, 94–97.
- Hwang, S.T., Urizar, N.L., Moore, D.D., and Henning, S.J. (2002). Bile acids regulate the ontogenic expression of ileal bile acid binding protein in the rat via the farnesoid X receptor. *Gastroenterology* 122, 1483–1492.
- Hyppönen, E., Smith, G.D., and Power, C. (2003). Parental diabetes and birth weight of offspring: intergenerational cohort study. *BMJ* 326, 19–20.
- Ihara, M., Meyer-Ficca, M.L., Leu, N.A., Rao, S., Li, F., Gregory, B.D., Zalenskaya, I.A., Schultz, R.M., and Meyer, R.G. (2014). Paternal poly (ADP-ribose) metabolism modulates retention of inheritable sperm histones and early embryonic gene expression. *PLoS Genet.* 10, e1004317.
- Illingworth, R.S., and Bird, A.P. (2009). CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett.* 583, 1713–1720.
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C.L., McDonald, J.G., Luo, G., Jones, S.A., Goodwin, B., Richardson, J.A., et al. (2005). Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* 2, 217–225.
- Inagaki, T., Moschetta, A., Lee, Y.-K., Peng, L., Zhao, G., Downes, M., Yu, R.T., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Repa, J.J., et al. (2006). Regulation of antibacterial defense in the small intestine by the nuclear bile acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3920–3925.
- Ishibashi, S., Schwarz, M., Frykman, P.K., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. I. Postnatal lethality reversed by bile acid and vitamin supplementation. *J. Biol. Chem.* 271, 18017–18023.
- Ito, M., Yu, R., and Jameson, J.L. (1997). DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1476–1483.
- Ito, S., Fujimori, T., Furuya, A., Satoh, J., Nabeshima, Y., and Nabeshima, Y.-I. (2005). Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking betaKlotho. *J. Clin. Invest.* 115, 2202–2208.
- Jacquemin, E., Lykavieris, P., Chaoui, N., Hadchouel, M., and Bernard, O. (1998). Transient neonatal cholestasis: origin and outcome. *J. Pediatr.* 133, 563–567.
- Jahnukainen, K., Chrysis, D., Hou, M., Parvinen, M., Eksborg, S., and Söder, O. (2004). Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biol. Reprod.* 70, 290–296.
- Janecki, A., Jakubowiak, A., and Steinberger, A. (1991). Effects of cyclic AMP and phorbol ester on transepithelial electrical resistance of Sertoli cell monolayers in two-compartment culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 82, 61–69.

- Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728–731.
- Jayle, M.F., Scholler, R., Sfikakis, A., and Heron, M. (1962). [Excretion of phenol steroids and 17-ketosteroids after the administration of chorionic gonadotropins to men]. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 7, 212–220.
- Jazrawi, R.P., Pazzi, P., Petroni, M.L., Prandini, N., Paul, C., Adam, J.A., Gullini, S., and Northfield, T.C. (1995). Postprandial gallbladder motor function: refilling and turnover of bile in health and in cholelithiasis. *Gastroenterology* 109, 582–591.
- Jégou, B. (1992). The Sertoli cell. *Baillières Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 273–311.
- Jegou, B., Pineau, C., and Dupaix, A. (1995). La cellule de Sertoli : actualisation du concept de cellule nourricière. *MS Médecine Sci.* 11, 519–527.
- Jinawath, A., Miyake, S., Yanagisawa, Y., Akiyama, Y., and Yuasa, Y. (2005). Transcriptional regulation of the human DNA methyltransferase 3A and 3B genes by Sp3 and Sp1 zinc finger proteins. *Biochem. J.* 385, 557–564.
- Johnston, H., Baker, P.J., Abel, M., Charlton, H.M., Jackson, G., Fleming, L., Kumar, T.R., and O'Shaughnessy, P.J. (2004). Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology* 145, 318–329.
- Jones, P.A., and Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat. Rev. Genet.* 10, 805–811.
- Jonsson, C.K., Zetterström, R.H., Holst, M., Parvinen, M., and Söder, O. (1999). Constitutive expression of interleukin-1alpha messenger ribonucleic acid in rat Sertoli cells is dependent upon interaction with germ cells. *Endocrinology* 140, 3755–3761.
- Joshi, D., James, A., Quaglia, A., Westbrook, R.H., and Heneghan, M.A. (2010). Liver disease in pregnancy. *Lancet* 375, 594–605.
- Journe, F., Laurent, G., Chaboteaux, C., Nonclercq, D., Durbecq, V., Larsimont, D., and Body, J.-J. (2008). Farnesol, a mevalonate pathway intermediate, stimulates MCF-7 breast cancer cell growth through farnesoid-X-receptor-mediated estrogen receptor activation. *Breast Cancer Res. Treat.* 107, 49–61.
- Journe, F., Durbecq, V., Chaboteaux, C., Rouas, G., Laurent, G., Nonclercq, D., Sotiriou, C., Body, J.-J., and Larsimont, D. (2009). Association between farnesoid X receptor expression and cell proliferation in estrogen receptor-positive luminal-like breast cancer from postmenopausal patients. *Breast Cancer Res. Treat.* 115, 523–535.
- Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., and European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *Eur. Urol.* 62, 324–332.
- Jutte, N.H., Grootegeed, J.A., Rommerts, F.F., and van der Molen, H.J. (1981). Exogenous lactate is essential for metabolic activities in isolated rat spermatocytes and spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 62, 399–405.

- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429, 900–903.
- Karzai, A.W., and Wright, W.W. (1992). Regulation of the synthesis and secretion of transferrin and cyclic protein-2/cathepsin L by mature rat Sertoli cells in culture. *Biol. Reprod.* 47, 823–831.
- Kast, H.R., Nguyen, C.M., Sinal, C.J., Jones, S.A., Laffitte, B.A., Reue, K., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2001). Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 15, 1720–1728.
- Kawakami, S., and Winters, S.J. (1999). Regulation of lutenizing hormone secretion and subunit messenger ribonucleic acid expression by gonadal steroids in perfused pituitary cells from male monkeys and rats. *Endocrinology* 140, 3587–3593.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., et al. (2003). A G Protein-coupled Receptor Responsive to Bile Acids. *J. Biol. Chem.* 278, 9435–9440.
- Keeney, D.S., and Mason, J.I. (1992). Regulation of expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase is mediated by cAMP in rat Leydig cells and H540 rat Leydig tumor cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 43, 915–922.
- Keitel, V., and Häussinger, D. (2011). TGR5 in the biliary tree. *Dig. Dis. Basel Switz.* 29, 45–47.
- Keitel, V., and Häussinger, D. (2012). Perspective: TGR5 (Gpbar-1) in liver physiology and disease. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 36, 412–419.
- Keitel, V., Reinehr, R., Gatsios, P., Rupprecht, C., Görg, B., Selbach, O., Häussinger, D., and Kubitz, R. (2007). The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatol. Baltim. Md* 45, 695–704.
- Keitel, V., Donner, M., Winandy, S., Kubitz, R., and Häussinger, D. (2008). Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 78–84.
- Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., and Häussinger, D. (2010a). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia* 58, 1794–1805.
- Keitel, V., Ullmer, C., and Häussinger, D. (2010b). The membrane-bound bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) is localized in the primary cilium of cholangiocytes. *Biol. Chem.* 391, 785–789.
- Keitel, V., Reich, M., and Häussinger, D. (2014). TGR5: Pathogenetic Role and/or Therapeutic Target in Fibrosing Cholangitis? *Clin. Rev. Allergy Immunol.*
- Keller, C., and Bühler, M. (2013). Chromatin-associated ncRNA activities. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 21, 627–641.
- Kelly, T.L.J., Li, E., and Trasler, J.M. (2003). 5-Aza-2'-Deoxycytidine Induces Alterations in Murine Spermatogenesis and Pregnancy Outcome. *J. Androl.* 24, 822–830.
- Kent, J., Wheatley, S.C., Andrews, J.E., Sinclair, A.H., and Koopman, P. (1996). A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development* 122, 2813–2822.

- Keppler, D. (2011). Cholestasis and the role of basolateral efflux pumps. *Z. Für Gastroenterol.* 49, 1553–1557.
- Kerlan, V., Dreano, Y., Bercovici, J.P., Beaune, P.H., Floch, H.H., and Berthou, F. (1992). Nature of cytochromes P450 involved in the 2-/4-hydroxylations of estradiol in human liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 44, 1745–1756.
- Kerr, J.B., and de Kretser, D.M. (1974). Proceedings: The role of the Sertoli cell in phagocytosis of the residual bodies of spermatids. *J. Reprod. Fertil.* 36, 439–440.
- Kidambi, S., and Patel, S.B. (2008). Cholesterol and non-cholesterol sterol transporters: ABCG5, ABCG8 and NPC1L1: a review. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 38, 1119–1139.
- Kierszenbaum, A.L., Gil, M., Rivkin, E., and Tres, L.L. (2002). Ran, a GTP-binding protein involved in nucleocytoplasmic transport and microtubule nucleation, relocates from the manchette to the centrosome region during rat spermiogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 131–140.
- Kim, I., Morimura, K., Shah, Y., Yang, Q., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J. (2007). Spontaneous hepatocarcinogenesis in farnesoid X receptor-null mice. *Carcinogenesis* 28, 940–946.
- Kim, M.Y., Mauro, S., Gévry, N., Lis, J.T., and Kraus, W.L. (2004). NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119, 803–814.
- Kishikawa, S., Murata, T., Kimura, H., Shiota, K., and Yokoyama, K.K. (2002). Regulation of transcription of the Dnmt1 gene by Sp1 and Sp3 zinc finger proteins. *Eur. J. Biochem. FEBS* 269, 2961–2970.
- Kitada, T., Seki, S., Iwai, S., Yamada, T., Sakaguchi, H., and Wakasa, K. (2001). In situ detection of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in chronic human liver disease. *J. Hepatol.* 35, 613–618.
- Kobayashi, H., and Kono, T. (2012). DNA methylation analysis of germ cells by using bisulfite-based sequencing methods. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 825, 223–235.
- Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., Sasaki, H., Yaegashi, N., and Arima, T. (2007). Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2542–2551.
- Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y., and Kono, T. (2009). Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2. *Genomics* 93, 461–472.
- Koch, M., Olson, P.F., Albus, A., Jin, W., Hunter, D.D., Brunken, W.J., Burgeson, R.E., and Champlaud, M.F. (1999). Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J. Cell Biol.* 145, 605–618.
- Kong, B., Wang, L., Chiang, J.Y.L., Zhang, Y., Klaassen, C.D., and Guo, G.L. (2012). Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatol. Baltim. Md* 56, 1034–1043.

- Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348, 450–452.
- Koruk, M., Büyükberber, M., Savaş, C., and Kadayifçi, A. (2004). Paraneoplastic cholestasis associated with prostate carcinoma. *Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol.* 15, 53–55.
- Kotula-Balak, M., Gancarczyk, M., Sadowska, J., and Bilinska, B. (2009). The expression of aromatase, estrogen receptor α and estrogen receptor β in mouse Leydig cells in vitro that derived from cryptorchid males. *Eur. J. Histochem.* 49, 59–66.
- Koubova, J., Menke, D.B., Zhou, Q., Capel, B., Griswold, M.D., and Page, D.C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2474–2479.
- Kovacs, P., Kress, R., Rocha, J., Kurtz, U., Miquel, J.F., Nervi, F., Méndez-Sánchez, N., Uribe, M., Bock, H.H., Schirin-Sokhan, R., et al. (2008). Variation of the gene encoding the nuclear bile salt receptor FXR and gallstone susceptibility in mice and humans. *J. Hepatol.* 48, 116–124.
- Kowalski, A., Janosz-Gałydyś, I., Olejek, A., and Bodzek, P. (2014). [Correlation between serum levels of bile acids in pregnant women with intrahepatic cholestasis of pregnancy and condition of their newborns]. *Ginekol. Pol.* 85, 101–104.
- Krishnakumar, R., and Kraus, W.L. (2010). PARP-1 Regulates Chromatin Structure and Transcription through a KDM5B-Dependent Pathway. *Mol. Cell* 39, 736–749.
- Krishnamurthy, H., Danilovich, N., Morales, C.R., and Sairam, M.R. (2000). Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle-stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol. Reprod.* 62, 1146–1159.
- Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381–388.
- Kumar, D.P., Rajagopal, S., Mahavadi, S., Mirshahi, F., Grider, J.R., Murthy, K.S., and Sanyal, A.J. (2012). Activation of transmembrane bile acid receptor TGR5 stimulates insulin secretion in pancreatic β cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427, 600–605.
- Kunne, C., Acco, A., Duijst, S., de Waart, D.R., Paulusma, C.C., Gaemers, I., and Oude Elferink, R.P.J. (2014). FXR-dependent reduction of hepatic steatosis in a bile salt deficient mouse model. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 739–746.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., and Nakano, T. (2001). Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech. Dev.* 108, 121–133.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Watanabe, T., Gotoh, K., Totoki, Y., Toyoda, A., Ikawa, M., Asada, N., Kojima, K., Yamaguchi, Y., Ijiri, T.W., et al. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev.* 22, 908–917.
- Laberge, R.-M., and Boissonneault, G. (2005). On the nature and origin of DNA strand breaks in elongating spermatids. *Biol. Reprod.* 73, 289–296.
- Laffitte, B.A., Kast, H.R., Nguyen, C.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., and Edwards, P.A. (2000). Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X-activated receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 10638–10647.

- Lagergren, J., and Mattsson, F. (2011). Cholecystectomy as a risk factor for oesophageal adenocarcinoma. *Br. J. Surg.* 98, 1133–1137.
- Lalli, E., and Sassone-Corsi, P. (1994). Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* 269, 17359–17362.
- Lamberti, D., and Vicini, E. (2014). Promoter analysis of the gene encoding GDNF in murine Sertoli cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 394, 105–114.
- Lambrot, R., Jones, S., Saint-Phar, S., and Kimmins, S. (2012). Specialized Distribution of the Histone Methyltransferase Ezh2 in the Nuclear Apical Region of Round Spermatids and Its Interaction With the Histone Variant H1t2. *J. Androl.* 33, 1058–1066.
- Lampa, J., Hoogerbrugge, J.W., Baarends, W.M., Stanton, P.G., Perryman, K.J., Grootegoed, J.A., and Robertson, D.M. (1999). Follicle-stimulating hormone and testosterone stimulation of immature and mature Sertoli cells in vitro: inhibin and N-cadherin levels and round spermatid binding. *J. Androl.* 20, 399–406.
- Lavoie, B., Balemba, O.B., Godfrey, C., Watson, C.A., Vassileva, G., Corvera, C.U., Nelson, M.T., and Mawe, G.M. (2010). Hydrophobic bile salts inhibit gallbladder smooth muscle function via stimulation of GPBAR1 receptors and activation of KATP channels. *J. Physiol.* 588, 3295–3305.
- Lawless, M.W., Mankan, A.K., Ryan, A.W., and Norris, S. (2008). Tauroursodeoxycholic acid: relieving the pathogenesis of HFE C282Y hereditary hemochromatosis. *Hepatol. Baltim. Md* 48, 344–345.
- Layman, L.C. (2000). Mutations in the follicle-stimulating hormone-beta (FSH beta) and FSH receptor genes in mice and humans. *Semin. Reprod. Med.* 18, 5–10.
- Lee, L.K., and Foo, K.Y. (2014). Recent insights on the significance of transcriptomic and metabolomic analysis of male factor infertility. *Clin. Biochem.* 47, 973–982.
- Lee, C.G., Kim, Y.W., Kim, E.H., Meng, Z., Huang, W., Hwang, S.J., and Kim, S.G. (2012). Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1. *Gastroenterology* 142, 1206–1217.e7.
- Lee, F.Y., Kast-Woelbern, H.R., Chang, J., Luo, G., Jones, S.A., Fishbein, M.C., and Edwards, P.A. (2005). Alpha-crystallin is a target gene of the farnesoid X-activated receptor in human livers. *J. Biol. Chem.* 280, 31792–31800.
- Lee, J., Azzaroli, F., Wang, L., Soroka, C.J., Gigliozzi, A., Setchell, K.D., Kramer, W., and Boyer, J.L. (2001). Adaptive regulation of bile salt transporters in kidney and liver in obstructive cholestasis in the rat. *Gastroenterology* 121, 1473–1484.
- Lee, N.P.Y., Leung, K.-W., Wo, J.Y., Tam, P.-C., Yeung, W.S.B., and Luk, J.M. (2006). Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium. *Apoptosis* 11, 1215–1229.
- Lee, N.P.Y., Yeung, W.S.B., and Luk, J.M.C. (2007). Junction interaction in the seminiferous epithelium: regulatory roles of connexin-based gap junction. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 12, 1552–1562.
- Lee, N.P.Y., Wong, E.W.P., Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2009). Testicular cell junction: a novel target for male contraception. *Curr. Med. Chem.* 16, 906–915.

- Leers-Sucheta, S., Morohashi, K., Mason, J.I., and Melner, M.H. (1997). Synergistic activation of the human type II 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 272, 7960–7967.
- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., et al. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 3137–3140.
- Levitt, D.G., and Levitt, M.D. (2014). Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 7, 307–328.
- Li, M.W.M., Xia, W., Mruk, D.D., Wang, C.Q.F., Yan, H.H.N., Siu, M.K.Y., Lui, W.-Y., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2006). Tumor necrosis factor {alpha} reversibly disrupts the blood-testis barrier and impairs Sertoli-germ cell adhesion in the seminiferous epithelium of adult rat testes. *J. Endocrinol.* 190, 313–329.
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2009). Cytokines and junction restructuring events during spermatogenesis in the testis: an emerging concept of regulation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 20, 329–338.
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2010). Connexin 43 is critical to maintain the homeostasis of the blood-testis barrier via its effects on tight junction reassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17998–18003.
- Li, M.W.M., Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2012). Gap junctions and blood-tissue barriers. *Adv. Exp. Med. Biol.* 763, 260–280.
- Li, T., Holmstrom, S.R., Kir, S., Umetani, M., Schmidt, D.R., Kliewer, S.A., and Mangelsdorf, D.J. (2011). The G Protein-Coupled Bile Acid Receptor, TGR5, Stimulates Gallbladder Filling. *Mol. Endocrinol.* 25, 1066–1071.
- Lie, P.P.Y., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2009a). Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 (Eps8) is a novel regulator of cell adhesion and the blood-testis barrier integrity in the seminiferous epithelium. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 23, 2555–2567.
- Lie, P.P.Y., Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2009b). Coordinating cellular events during spermatogenesis: a biochemical model. *Trends Biochem. Sci.* 34, 366–373.
- Lie, P.P.Y., Chan, A.Y.N., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2010). Restricted Arp3 expression in the testis prevents blood-testis barrier disruption during junction restructuring at spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11411–11416.
- Lie, P.P.Y., Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2011). The biology of the desmosome-like junction a versatile anchoring junction and signal transducer in the seminiferous epithelium. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 286, 223–269.
- Lie, P.P.Y., Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2013). Signalling pathways regulating the blood-testis barrier. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 621–625.
- Lieu, T., Jayaweera, G., Zhao, P., Poole, D.P., Jensen, D., Grace, M., McIntyre, P., Bron, R., Wilson, Y.M., Krappitz, M., et al. (2014). The Bile Acid Receptor TGR5 Activates the TRPA1 Channel to Induce Itch in Mice. *Gastroenterology*.

- Lin, S.-P., Youngson, N., Takada, S., Seitz, H., Reik, W., Paulsen, M., Cavaille, J., and Ferguson-Smith, A.C. (2003). Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the Dlk1-Gtl2 imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat. Genet.* **35**, 97–102.
- Lindsay, R.S., Dabelea, D., Roumain, J., Hanson, R.L., Bennett, P.H., and Knowler, W.C. (2000). Type 2 diabetes and low birth weight: the role of paternal inheritance in the association of low birth weight and diabetes. *Diabetes* **49**, 445–449.
- Liu, Z., Zhou, S., Liao, L., Chen, X., Meistrich, M., and Xu, J. (2010). Jmjd1a Demethylase-regulated Histone Modification Is Essential for cAMP-response Element Modulator-regulated Gene Expression and Spermatogenesis. *J. Biol. Chem.* **285**, 2758–2770.
- Lu, T.T., Makishima, M., Repa, J.J., Schoonjans, K., Kerr, T.A., Auwerx, J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol. Cell* **6**, 507–515.
- Lu, Y., Heydel, J.-M., Li, X., Bratton, S., Lindblom, T., and Radominska-Pandya, A. (2005). Lithocholic acid decreases expression of UGT2B7 in Caco-2 cells: a potential role for a negative farnesoid X receptor response element. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **33**, 937–946.
- Lucas, T.F.G., Siu, E.R., Esteves, C.A., Monteiro, H.P., Oliveira, C.A., Porto, C.S., and Lazari, M.F.M. (2008). 17 β -estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* **78**, 101–114.
- Lui, W.-Y., and Cheng, C.Y. (2007). Regulation of cell junction dynamics by cytokines in the testis—A molecular and biochemical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 299–311.
- Lui, W.-Y., and Cheng, C.Y. (2012). TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF CELL ADHESION AT THE BLOOD-TESTIS BARRIER AND SPERMATOGENESIS IN THE TESTIS. *Adv. Exp. Med. Biol.* **763**, 281.
- Lui, W.-Y., and Lee, W.M. (2006). Regulation of junction dynamics in the testis—transcriptional and post-translational regulations of cell junction proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **250**, 25–35.
- Lui, W.-Y., and Lee, W.M. (2009). Molecular mechanisms by which hormones and cytokines regulate cell junction dynamics in the testis. *J. Mol. Endocrinol.* **43**, 43–51.
- Lui, W., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2003a). Transforming growth factor β 3 regulates the dynamics of Sertoli cell tight junctions via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biol. Reprod.* **68**, 1597–1612.
- Lui, W.Y., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2001). Transforming growth factor- β 3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via its effects on occludin, zonula occludens-1, and claudin-11. *Endocrinology* **142**, 1865–1877.
- Lui, W.-Y., Mruk, D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2003b). Sertoli Cell Tight Junction Dynamics: Their Regulation During Spermatogenesis. *Biol. Reprod.* **68**, 1087–1097.
- Lydka, M., Bilinska, B., Cheng, C.Y., and Mruk, D.D. (2012). Tumor necrosis factor α -mediated restructuring of the Sertoli cell barrier in vitro involves matrix metalloprotease 9 (MMP9), membrane-bound intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and the actin cytoskeleton. *Spermatogenesis* **2**, 294–303.

- Ma, K., Saha, P.K., Chan, L., and Moore, D.D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116, 1102–1109.
- Ma, T., Keller, J.A., and Yu, X. (2011). RNF8-dependent histone ubiquitination during DNA damage response and spermatogenesis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 339–345.
- MacLean, J.A., Hu, Z., Welborn, J.P., Song, H.-W., Rao, M.K., Wayne, C.M., and Wilkinson, M.F. (2013). The RHOX homeodomain proteins regulate the expression of insulin and other metabolic regulators in the testis. *J. Biol. Chem.* 288, 34809–34825.
- Maeda, K.-I., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., and Okamura, H. (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res.* 1364, 103–115.
- Maeda, T., Miyata, M., Yotsumoto, T., Kobayashi, D., Nozawa, T., Toyama, K., Gonzalez, F.J., Yamazoe, Y., and Tamai, I. (2004). Regulation of drug transporters by the farnesoid X receptor in mice. *Mol. Pharm.* 1, 281–289.
- Maffei, L., Rochira, V., Zirilli, L., Antunez, P., Aranda, C., Fabre, B., Simone, M.L., Pignatti, E., Simpson, E.R., Houssami, S., et al. (2007). A novel compound heterozygous mutation of the aromatase gene in an adult man: reinforced evidence on the relationship between congenital oestrogen deficiency, adiposity and the metabolic syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 67, 218–224.
- Mäkinen, S., Mäkelä, S., Weihua, Z., Warner, M., Rosenlund, B., Salmi, S., Hovatta, O., and Gustafsson, J.-Å. (2001). Localization of oestrogen receptors alpha and beta in human testis. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 497–503.
- Makishima, M., Okamoto, A.Y., Repa, J.J., Tu, H., Learned, R.M., Luk, A., Hull, M.V., Lustig, K.D., Mangelsdorf, D.J., and Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362–1365.
- Makishima, M., Lu, T.T., Xie, W., Whitfield, G.K., Domoto, H., Evans, R.M., Haussler, M.R., and Mangelsdorf, D.J. (2002). Vitamin D Receptor As an Intestinal Bile Acid Sensor. *Science* 296, 1313–1316.
- Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J., and Roldan, E.R.S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246–249.
- Mannuel, H.D., Mitikiri, N., and Hussain, A. (2011). Update on testicular germ cell tumors: Curr. Opin. Oncol. 23, 265–270.
- Mano, N., Nagaya, Y., Saito, S., Kobayashi, N., and Goto, J. (2004). Analysis of the Antigen Binding Site of Anti-Deoxycholate Monoclonal Antibody Using a Novel Affinity Labeling Reagent, Acyl Adenylate[†]. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 2041–2048.
- Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., et al. (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 488, 409–413.
- Manti, S., Romano, C., Chirico, V., Filippelli, M., Cuppari, C., Loddo, I., Salpietro, C., and Arrigo, T. (2014). Nonalcoholic Fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis in childhood: endocrine-metabolic “mal-programming.” *Hepat. Mon.* 14, e17641.

- Maqdasy, S., Baptissart, M., Vega, A., Baron, S., Lobaccaro, J.-M.A., and Volle, D.H. (2013). Cholesterol and male fertility: what about orphans and adopted? *Mol. Cell. Endocrinol.* 368, 30–46.
- Marciani, L., Cox, E.F., Hoad, C.L., Totman, J.J., Costigan, C., Singh, G., Shepherd, V., Chalkley, L., Robinson, M., Ison, R., et al. (2013). Effects of various food ingredients on gall bladder emptying. *Eur. J. Clin. Nutr.* 67, 1182–1187.
- Marcon, L., and Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* 70, 910–918.
- Marques, C.J., Carvalho, F., Sousa, M., and Barros, A. (2004). Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 363, 1700–1702.
- Martianov, I., Brancorsini, S., Catena, R., Gansmuller, A., Kotaja, N., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., and Davidson, I. (2005). Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2808–2813.
- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., and Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 714–719.
- Maruyama, T., Tanaka, K., Suzuki, J., Miyoshi, H., Harada, N., Nakamura, T., Miyamoto, Y., Kanatani, A., and Tamai, Y. (2006). Targeted disruption of G protein-coupled bile acid receptor 1 (Gpbar1/M-Bar) in mice. *J. Endocrinol.* 191, 197–205.
- De Mateo, S., Martínez-Heredia, J., Estanyol, J.M., Domínguez-Fandos, D., Domínguez-Fandos, D., Vidal-Taboada, J.M., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2007). Marked correlations in protein expression identified by proteomic analysis of human spermatozoa. *Proteomics* 7, 4264–4277.
- Mather, J.P., and Krummen, L.A. (1992). Inhibin, Activin, and Growth Factors: Paracrine Regulators of Testicular Function. In *Spermatogenesis — Fertilization — Contraception*, E. Nieschlag, and U.-F. Habenicht, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 169–200.
- Matsuo, Y., Nomata, K., Eguchi, J., Aoki, D., Hayashi, T., Hishikawa, Y., Kanetake, H., Shibata, Y., and Koji, T. (2007). Immunohistochemical analysis of connexin43 expression in infertile human testes. *Acta Histochem. Cytochem.* 40, 69–75.
- Matzuk, M.M., and Lamb, D.J. (2008). The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat. Med.* 14, 1197–1213.
- McFarland, K.C., Sprengel, R., Phillips, H.S., Kohler, M., Rosemblyt, N., Nikolics, K., Segaloff, D.L., and Seeburg, P.H. (1989). Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. *Science* 245, 494–499.
- McLean, D.J., Friel, P.J., Pouchnik, D., and Griswold, M.D. (2002). Oligonucleotide Microarray Analysis of Gene Expression in Follicle-Stimulating Hormone-Treated Rat Sertoli Cells. *Mol. Endocrinol.* 16, 2780–2792.
- McMahon, M., Gerich, J., and Rizza, R. (1988). Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes. Metab. Rev.* 4, 17–30.

- McPherson, S., and Longo, F.J. (1993). Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur. J. Histochem. EJB* 37, 109–128.
- McQuaid, K.R., Laine, L., Fennerty, M.B., Souza, R., and Spechler, S.J. (2011). Systematic review: the role of bile acids in the pathogenesis of gastro-oesophageal reflux disease and related neoplasia. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 146–165.
- Méndez-Sánchez, N., Chavez-Tapia, N.C., Motola-Kuba, D., Sanchez-Lara, K., Ponciano-Rodríguez, G., Baptista, H., Ramos, M.H., and Uribe, M. (2005). Metabolic syndrome as a risk factor for gallstone disease. *World J. Gastroenterol. WJG* 11, 1653–1657.
- Mengual, L., Ballescá, J.L., Ascaso, C., and Oliva, R. (2003). Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from percoll fractions between patients and controls. *J. Androl.* 24, 438–447.
- Meunier, L., Siddeek, B., Vega, A., Lakhdari, N., Inoubli, L., Bellon, R.P., Lemaire, G., Mauduit, C., and Benahmed, M. (2012). Perinatal programming of adult rat germ cell death after exposure to xenoestrogens: role of microRNA miR-29 family in the down-regulation of DNA methyltransferases and Mcl-1. *Endocrinology* 153, 1936–1947.
- Meyer-Ficca, M.L., Lonchar, J., Credidio, C., Ihara, M., Li, Y., Wang, Z.-Q., and Meyer, R.G. (2009). Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biol. Reprod.* 81, 46–55.
- Meyer-Ficca, M.L., Ihara, M., Lonchar, J.D., Meistrich, M.L., Austin, C.A., Min, W., Wang, Z.-Q., and Meyer, R.G. (2011). Poly(ADP-ribose) metabolism is essential for proper nucleoprotein exchange during mouse spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 84, 218–228.
- Meyer-Gerspach, A.C., Steinert, R.E., Keller, S., Malarski, A., Schulte, F.H., and Beglinger, C. (2013). Effects of Chenodeoxycholic Acid on the Secretion of Gut Peptides and Fibroblast Growth Factors in Healthy Humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 3351–3358.
- Milstein, H.J., Bloomer, J.R., and Klatskin, G. (1976). Serum bile acids in alcoholic liver disease. Comparison with histological features of the disease. *Am. J. Dig. Dis.* 21, 281–285.
- Van Mil, S.W.C., Milona, A., Dixon, P.H., Mullenbach, R., Geenes, V.L., Chambers, J., Shevchuk, V., Moore, G.E., Lammert, F., Glantz, A.G., et al. (2007). Functional variants of the central bile acid sensor FXR identified in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Gastroenterology* 133, 507–516.
- Mita, M., and Hall, P.F. (1982). Metabolism of round spermatids from rats: lactate as the preferred substrate. *Biol. Reprod.* 26, 445–455.
- Mita, M., Borland, K., Price, J.M., and Hall, P.F. (1985). The influence of insulin and insulin-like growth factor-I on hexose transport by Sertoli cells. *Endocrinology* 116, 987–992.
- Monte, M.J., Marin, J.J.G., Antelo, A., and Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J. Gastroenterol. WJG* 15, 804–816.
- Mooradian, A.D., Shamma'a, M., Salti, I., and Cortas, N. (1985). Hypophyseal-gonadal dysfunction in men with non-alcoholic liver cirrhosis. *Andrologia* 17, 72–79.

- Morales, C.R., Kwon, Y.K., and Hecht, N.B. (1991). Cytoplasmic localization during storage and translation of the mRNAs of transition protein 1 and protamine 1, two translationally regulated transcripts of the mammalian testis. *J. Cell Sci.* 100 (Pt 1), 119–131.
- Morinière, J., Rousseaux, S., Steuerwald, U., Soler-López, M., Curtet, S., Vitte, A.-L., Govin, J., Gaucher, J., Sadoul, K., Hart, D.J., et al. (2009). Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* 461, 664–668.
- Morris, P.L., Vale, W.W., Cappel, S., and Bardin, C.W. (1988). Inhibin Production by Primary Sertoli Cell-Enriched Cultures: Regulation by Follicle-Stimulating Hormone, Androgens, and Epidermal Growth Factor. *Endocrinology* 122, 717–725.
- Moss, A.C., Morris, E., and Mac Mathuna, P. (2006). Palliative biliary stents for obstructing pancreatic carcinoma. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD004200.
- Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocr. Rev.* 25, 747–806.
- Mruk, D.D., Siu, M.K.Y., Conway, A.M., Lee, N.P.Y., Lau, A.S.N., and Cheng, C.Y. (2003). Role of tissue inhibitor of metalloproteases-1 in junction dynamics in the testis. *J. Androl.* 24, 510–523.
- Mueller, M., Cima, I., Noti, M., Fuhrer, A., Jakob, S., Dubuquoy, L., Schoonjans, K., and Brunner, T. (2006). The nuclear receptor LRH-1 critically regulates extra-adrenal glucocorticoid synthesis in the intestine. *J. Exp. Med.* 203, 2057–2062.
- Mulholland, D.J., Dedhar, S., and Vogl, A.W. (2001). Rat seminiferous epithelium contains a unique junction (Ectoplasmic specialization) with signaling properties both of cell/cell and cell/matrix junctions. *Biol. Reprod.* 64, 396–407.
- Müssig, K., Staiger, H., Machicao, F., Machann, J., Schick, F., Schäfer, S.A., Claussen, C.D., Holst, J.J., Gallwitz, B., Stefan, N., et al. (2009). Preliminary report: genetic variation within the GPBAR1 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 58, 1809–1811.
- Nagano, M.C. (2003). Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol. Reprod.* 69, 701–707.
- Nakamoto, Y., and Kaneko, S. (2003). Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury. *Curr. Mol. Med.* 3, 537–544.
- Nakamura, M., Okinaga, S., and Arai, K. (1984). Metabolism of round spermatids: evidence that lactate is preferred substrate. *Am. J. Physiol.* 247, E234–E242.
- Nakamura, T., Liu, Y.-J., Nakashima, H., Umehara, H., Inoue, K., Matoba, S., Tachibana, M., Ogura, A., Shinkai, Y., and Nakano, T. (2012). PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature* 486, 415–419.
- Nakayama, Y., Yamamoto, T., and Abé, S.I. (1999). IGF-I, IGF-II and insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of newt testes. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 343–347.

- Nantel, F., Monaco, L., Foulkes, N.S., Masquilier, D., LeMeur, M., Henriksen, K., Dierich, A., Parvinen, M., and Sassone-Corsi, P. (1996). Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature* 380, 159–162.
- Nebert, D.W., and Russell, D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* 360, 1155–1162.
- Nehar, D., Mauduit, C., Boussouar, F., and Benahmed, M. (1998). Interleukin 1 α stimulates lactate dehydrogenase A expression and lactate production in cultured porcine sertoli cells. *Biol. Reprod.* 59, 1425–1432.
- Neimark, E., Chen, F., Li, X., and Shneider, B.L. (2004). Bile acid-induced negative feedback regulation of the human ileal bile acid transporter. *Hepatology* 40, 149–156.
- Netto, G.J., Nakai, Y., Nakayama, M., Jadallah, S., Toubaji, A., Nonomura, N., Albadine, R., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Yegnasubramanian, S., et al. (2008). Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 21, 1337–1344.
- Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A.Y., and Shan, B. (1999). CPF: An orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 6660–6665.
- Norlin, M., Andersson, U., Björkhem, I., and Wikvall, K. (2000). Oxysterol 7 α -hydroxylase activity by cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A). *J. Biol. Chem.* 275, 34046–34053.
- N'Tumba-Byn, T., Moison, D., Lacroix, M., Lecureuil, C., Lesage, L., Prud'homme, S.M., Pozzi-Gaudin, S., Frydman, R., Benachi, A., Livera, G., et al. (2012). Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PloS One* 7, e51579.
- Oakberg, E.F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 99, 507–516.
- Oakes, C.C., La Salle, S., Smiraglia, D.J., Robaire, B., and Trasler, J.M. (2007). Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev. Biol.* 307, 368–379.
- Oakes, M.B., Eyvazzadeh, A.D., Quint, E., and Smith, Y.R. (2008). Complete Androgen Insensitivity Syndrome—A Review. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* 21, 305–310.
- Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 263–286.
- Oatley, J.M., and Brinster, R.L. (2012). The germline stem cell niche unit in mammalian testes. *Physiol. Rev.* 92, 577–595.
- O'Donnell, L., Nicholls, P.K., O'Bryan, M.K., McLachlan, R.I., and Stanton, P.G. (2011). Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1, 14–35.
- O'Flynn O'Brien, K.L., Varghese, A.C., and Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil. Steril.* 93, 1–12.

- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., et al. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436, 207–213.
- Okada, Y., Tateishi, K., and Zhang, Y. (2010). Histone Demethylase JHDM2A Is Involved in Male Infertility and Obesity. *J. Androl.* 31, 75–78.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Okuma, Y., O'Connor, A.E., Hayashi, T., Loveland, K.L., Kretser, D.M. de, and Hedger, M.P. (2006). Regulated production of activin A and inhibin B throughout the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *J. Endocrinol.* 190, 331–340.
- Okumura, K., Lee, I.P., and Dixon, R.L. (1975). Permeability of selected drugs and chemicals across the blood-testis barrier of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194, 89–95.
- Oliveira, P.F., Alves, M.G., Rato, L., Silva, J., Sá, R., Barros, A., Sousa, M., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., and Socorro, S. (2011). Influence of 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol on human Sertoli cells metabolism. *Int. J. Androl.* 34, e612–e620.
- Omisanjo, O.A., Biermann, K., Hartmann, S., Heukamp, L.C., Sonnack, V., Hild, A., Brehm, R., Bergmann, M., Weidner, W., and Steger, K. (2007). DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem. Cell Biol.* 127, 175–181.
- Ong, J.P., and Younossi, Z.M. (2007). Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin. Liver Dis.* 11, 1–16, vii.
- Ooi, S.L., and Henikoff, S. (2007). Germline histone dynamics and epigenetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 257–265.
- Ooi, S.K.T., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.-P., Allis, C.D., et al. (2007). DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 448, 714–717.
- Opherck, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmüller, D., Schulze, A., Schmid, W., and Schütz, G. (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 1346–1353.
- Ortlund, E.A., Lee, Y., Solomon, I.H., Hager, J.M., Safi, R., Choi, Y., Guan, Z., Tripathy, A., Raetz, C.R.H., McDonnell, D.P., et al. (2005). Modulation of human nuclear receptor LHR-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 357–363.
- O'Shaughnessy, P.J., Johnston, H., Willerton, L., and Baker, P.J. (2002). Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J. Cell Sci.* 115, 3491–3496.
- O'Shaughnessy, P.J., Abel, M., Charlton, H.M., Hu, B., Johnston, H., and Baker, P.J. (2007). Altered expression of genes involved in regulation of vitamin A metabolism, solute transportation, and cytoskeletal function in the androgen-insensitive tfm mouse testis. *Endocrinology* 148, 2914–2924.

- O'Shaughnessy, P.J., Morris, I.D., Huhtaniemi, I., Baker, P.J., and Abel, M.H. (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 2–8.
- Oshima, A. (2014). Structure and closure of connexin gap junction channels. *FEBS Lett.* 588, 1230–1237.
- Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Décimo, D., Gansmuller, A., Heyberger, S., Dollé, P., Bronner, S., Lutz, Y., and Chambon, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J. Cell Biol.* 135, 469–477.
- Padmanabhan, V., and McNeilly, A.S. (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 121, 21–30.
- Palmero, S., Prati, M., Bolla, F., and Fugassa, E. (1995). Tri-iodothyronine directly affects rat Sertoli cell proliferation and differentiation. *J. Endocrinol.* 145, 355–362.
- Papacleovoulou, G., Abu-Hayyeh, S., Nikolopoulou, E., Briz, O., Owen, B.M., Nikolova, V., Ovadia, C., Huang, X., Vaarasmaki, M., Baumann, M., et al. (2013). Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring. *J. Clin. Invest.* 123, 3172–3181.
- Park, Y.-J., and Luger, K. (2008). Histone chaperones in nucleosome eviction and histone exchange. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 282–289.
- Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., et al. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365–1368.
- Patti, M.-E., Houten, S.M., Bianco, A.C., Bernier, R., Larsen, P.R., Holst, J.J., Badman, M.K., Maratos-Flier, E., Mun, E.C., Pihlajamäki, J., et al. (2009). Serum Bile Acids Are Higher in Humans With Prior Gastric Bypass: Potential Contribution to Improved Glucose and Lipid Metabolism. *Obesity* 17, 1671–1677.
- Pawłowska, J., Bogoniowska, Z., Szczygielska-Kozak, M., Wróblewska, Z., and Socha, J. (1990). Value of bile acid determination for the diagnosis of neonatal jaundice. *Mater. Medica Pol. Pol. J. Med. Pharm.* 22, 112–117.
- Péan, N., Doignon, I., Garcin, I., Besnard, A., Julien, B., Liu, B., Branchereau, S., Spraul, A., Guettier, C., Humbert, L., et al. (2013). The receptor TGR5 protects the liver from bile acid overload during liver regeneration in mice. *Hepatology* 58, 1451–1460.
- Peet, D.J., Turley, S.D., Ma, W., Janowski, B.A., Lobaccaro, J.M., Hammer, R.E., and Mangelsdorf, D.J. (1998). Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell* 93, 693–704.
- Pelletier, R.M., and Byers, S.W. (1992). The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc. Res. Tech.* 20, 3–33.
- Pellicciari, R., Gioiello, A., Macchiarulo, A., Thomas, C., Rosatelli, E., Natalini, B., Sardella, R., Pruzanski, M., Roda, A., Pastorini, E., et al. (2009). Discovery of 6 α -Ethyl-23(S)-methylcholic Acid (S-EMCA, INT-777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabesity. *J. Med. Chem.* 52, 7958–7961.

Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky Business: Orchestrating Cellular Signals at Adherens Junctions. *Cell* 112, 535–548.

Petersen, C., and Soder, O. (2006). The sertoli cell--a hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66, 153–161.

Petitti, D.B., Friedman, G.D., and Klatsky, A.L. (1981). Association of a history of gallbladder disease with a reduced concentration of high-density-lipoprotein cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 304, 1396–1398.

Pitetti, J.-L., Calvel, P., Zimmermann, C., Conne, B., Papaioannou, M.D., Aubry, F., Cederroth, C.R., Urner, F., Fumel, B., Crausaz, M., et al. (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 27, 814–827.

Pittoggi, C., Renzi, L., Zaccagnini, G., Cimini, D., Degrassi, F., Giordano, R., Magnano, A.R., Lorenzini, R., Lavia, P., and Spadafora, C. (1999). A fraction of mouse sperm chromatin is organized in nucleosomal hypersensitive domains enriched in retroposon DNA. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 20), 3537–3548.

Pivot-Pajot, C., Caron, C., Govin, J., Vion, A., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2003). Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5354–5365.

Pointis, G., and Segretain, D. (2005). Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 300–306.

Pöllänen, P., Söder, O., and Parvinen, M. (1989). Interleukin-1 alpha stimulation of spermatogonial proliferation in vivo. *Reprod. Fertil. Dev.* 1, 85–87.

Poplinski, A., Tüttelmann, F., Kanber, D., Horsthemke, B., and Gromoll, J. (2010). Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. *Int. J. Androl.* 33, 642–649.

Portincasa, P., Di Ciaula, A., Wang, H.H., Palasciano, G., van Erpecum, K.J., Moschetta, A., and Wang, D.Q.-H. (2008). Coordinate regulation of gallbladder motor function in the gut-liver axis. *Hepatology. Baltim. Md* 47, 2112–2126.

Poupon, R. (2010). Primary biliary cirrhosis: a 2010 update. *J. Hepatology.* 52, 745–758.

Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine (2012). Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 98, 294–301.

Print, C.G., and Loveland, K.L. (2000). Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22, 423–430.

Pusch, H.H. (1984). [Diagnosis of a toxic liver lesion based on spermiographic changes]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 96, 857–859.

Ramalho-Santos, J., Moreno, R.D., Wessel, G.M., Chan, E.K., and Schatten, G. (2001). Membrane trafficking machinery components associated with the mammalian acrosome during spermiogenesis. *Exp. Cell Res.* 267, 45–60.

- Rando, O.J. (2012). Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. *Cell* 151, 702–708.
- Rao, M.K., Wayne, C.M., Meistrich, M.L., and Wilkinson, M.F. (2003). Pem homeobox gene promoter sequences that direct transcription in a Sertoli cell-specific, stage-specific, and androgen-dependent manner in the testis in vivo. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 17, 223–233.
- Rathke, C., Baarends, W.M., Jayaramaiah-Raja, S., Bartkuhn, M., Renkawitz, R., and Renkawitz-Pohl, R. (2007). Transition from a nucleosome-based to a protamine-based chromatin configuration during spermiogenesis in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 120, 1689–1700.
- Rato, L., Socorro, S., Cavaco, J.E.B., and Oliveira, P.F. (2010). Tubular Fluid Secretion in the Seminiferous Epithelium: Ion Transporters and Aquaporins in Sertoli Cells. *J. Membr. Biol.* 236, 215–224.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Duarte, A.I., Cavaco, J.E., and Oliveira, P.F. (2012a). Metabolic regulation is important for spermatogenesis. *Nat. Rev. Urol.* 9, 330–338.
- Rato, L., Alves, M.G., Socorro, S., Carvalho, R.A., Cavaco, J.E., and Oliveira, P.F. (2012b). Metabolic modulation induced by oestradiol and DHT in immature rat Sertoli cells cultured in vitro. *Biosci. Rep.* 32, 61–69.
- Raverdeau, M., Gely-Pernot, A., Féret, B., Dennefeld, C., Benoit, G., Davidson, I., Chambon, P., Mark, M., and Ghyselinck, N.B. (2012). Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 16582–16587.
- Rey, R.A., Musse, M., Venara, M., and Chemes, H.E. (2009). Ontogeny of the androgen receptor expression in the fetal and postnatal testis: its relevance on Sertoli cell maturation and the onset of adult spermatogenesis. *Microsc. Res. Tech.* 72, 787–795.
- Risley, M.S. (2000). Connexin Gene Expression in Seminiferous Tubules of the Sprague-Dawley Rat. *Biol. Reprod.* 62, 748–754.
- Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., Graves, K.H., McLachlan, R.I., and Simpson, E.R. (1999). Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7986–7991.
- Robin, G., Boitrelle, F., Marcelli, F., Colin, P., Leroy-Martin, B., Mitchell, V., Dewailly, D., and Rigot, J.-M. (2010). Cryptorchidie : de la physiopathologie à l'infertilité. *Gynécologie Obstétrique Fertil.* 38, 588–599.
- Robinson, R., and Fritz, I.B. (1981). Metabolism of glucose by Sertoli cells in culture. *Biol. Reprod.* 24, 1032–1041.
- Rodrigues, C.M., Fan, G., Wong, P.Y., Kren, B.T., and Steer, C.J. (1998). Ursodeoxycholic acid may inhibit deoxycholic acid-induced apoptosis by modulating mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen species production. *Mol. Med. Camb. Mass* 4, 165–178.
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., and Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J.* 16, 2262–2270.

- Roger, C., Mograbi, B., Chevallier, D., Michiels, J., Tanaka, H., Segretain, D., Pointis, G., and Fenichel, P. (2004). Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. *J. Pathol.* 202, 241–246.
- Romrell, L.J., and Ross, M.H. (1979). Characterization of Sertoli cell-germ cell junctional specializations in dissociated testicular cells. *Anat. Rec.* 193, 23–41.
- De Rooij, D.G. (1998). Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.* 79, 67–80.
- De Rooij, D.G., and Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21, 776–798.
- Rose, K.A., Stapleton, G., Dott, K., Kieny, M.P., Best, R., Schwarz, M., Russell, D.W., Björkhem, I., Seckl, J., and Lathe, R. (1997). Cyp7b, a novel brain cytochrome P450, catalyzes the synthesis of neurosteroids 7 α -hydroxy dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy pregnenolone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4925–4930.
- Rosner, W. (1991). Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 20, 697–720.
- Ross, A.J., and Capel, B. (2005). Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 19–25.
- Rossi, P., Sette, C., Dolci, S., and Geremia, R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 609–615.
- Rottach, A., Leonhardt, H., and Spada, F. (2009). DNA methylation-mediated epigenetic control. *J. Cell. Biochem.* 108, 43–51.
- Rousseaux, S., Reynoird, N., Escoffier, E., Thevenon, J., Caron, C., and Khochbin, S. (2008). Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod. Biomed. Online* 16, 492–503.
- Royer, C., Lucas, T.F.G., Lazari, M.F.M., and Porto, C.S. (2012). 17 β -estradiol signaling and regulation of proliferation and apoptosis of rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 86, 108.
- Russell, D.W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.
- Russell, L. (1977a). Observations on rat sertoli ectoplasmic (“junctional”) specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 9, 475–498.
- Russell, L. (1977b). Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. *Am. J. Anat.* 148, 313–328.
- Russell, L. (1977c). Observations on rat Sertoli ectoplasmic (‘junctional’) specializations in their association with germ cells of the rat testis. *Tissue Cell* 9, 475–498.
- Russell, L.D. (1979). Observations on the inter-relationships of Sertoli cells at the level of the blood-testis barrier: evidence for formation and resorption of Sertoli-Sertoli tubulobulbar complexes during the spermatogenic cycle of the rat. *Am. J. Anat.* 155, 259–279.

- Russell, D.W., and Wilson, J.D. (1994). Steroid 5 α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 25–61.
- Russell, L., and Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat. Rec.* 185, 259–278.
- Russell, L.D., and Malone, J.P. (1980). A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell* 12, 263–285.
- Russell, L.D., and Peterson, R.N. (1985). Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. *Int. Rev. Cytol.* 94, 177–211.
- Russell, L.D., Corbin, T.J., Borg, K.E., De França, L.R., Grasso, P., and Bartke, A. (1993). Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 133, 2062–2070.
- Sadate-Ngatchou, P.I., Pouchnik, D.J., and Griswold, M.D. (2004). Follicle-stimulating hormone induced changes in gene expression of murine testis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 18, 2805–2816.
- Saez, J.M. (1994). Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. *Endocr. Rev.* 15, 574–626.
- Sakorafas, G.H., Milingos, D., and Peros, G. (2007). Asymptomatic cholelithiasis: is cholecystectomy really needed? A critical reappraisal 15 years after the introduction of laparoscopic cholecystectomy. *Dig. Dis. Sci.* 52, 1313–1325.
- La Salle, S., and Trasler, J.M. (2006). Dynamic expression of DNMT3a and DNMT3b isoforms during male germ cell development in the mouse. *Dev. Biol.* 296, 71–82.
- La Salle, S., Mertineit, C., Taketo, T., Moens, P.B., Bestor, T.H., and Trasler, J.M. (2004). Windows for sex-specific methylation marked by DNA methyltransferase expression profiles in mouse germ cells. *Dev. Biol.* 268, 403–415.
- La Salle, S., Oakes, C.C., Neaga, O.R., Bourc’his, D., Bestor, T.H., and Trasler, J.M. (2007). Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev. Biol.* 7, 104.
- Sato, H., Genet, C., Strehle, A., Thomas, C., Lobstein, A., Wagner, A., Mioskowski, C., Auwerx, J., and Saladin, R. (2007). Anti-hyperglycemic activity of a TGR5 agonist isolated from *Olea europaea*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 793–798.
- Sato, H., Macchiarulo, A., Thomas, C., Gioiello, A., Une, M., Hofmann, A.F., Saladin, R., Schoonjans, K., Pellicciari, R., and Auwerx, J. (2008). Novel Potent and Selective Bile Acid Derivatives as TGR5 Agonists: Biological Screening, Structure–Activity Relationships, and Molecular Modeling Studies. *J. Med. Chem.* 51, 1831–1841.
- Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., et al. (2004). Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1673–1678.
- Schirmer, B.D., Winters, K.L., and Edlich, R.F. (2005). Cholelithiasis and Cholecystitis. *J. Long. Term Eff. Med. Implants* 15, 329–338.

- Schoeters, G., Den Hond, E., Dhooge, W., Van Larebeke, N., and Leijls, M. (2008). Endocrine Disruptors and Abnormalities of Pubertal Development. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 102, 168–175.
- Schteingart, H.F., Meroni, S.B., Cánepa, D.F., Pellizzari, E.H., and Cigorraga, S.B. (1999). Effects of basic fibroblast growth factor and nerve growth factor on lactate production, gamma-glutamyl transpeptidase and aromatase activities in cultured Sertoli cells. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* 141, 539–545.
- Schulz, R., Woodfine, K., Menheniott, T.R., Bourc’his, D., Bestor, T., and Oakey, R.J. (2008). WAMIDEX: a web atlas of murine genomic imprinting and differential expression. *Epigenetics Off. J. DNA Methylation Soc.* 3, 89–96.
- Schwarz, M., Lund, E.G., Setchell, K.D., Kayden, H.J., Zerwekh, J.E., Björkhem, I., Herz, J., and Russell, D.W. (1996). Disruption of cholesterol 7 α -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 α -hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 18024–18031.
- Segretain, D., Decrouy, X., Dompierre, J., Escalier, D., Rahman, N., Fiorini, C., Mograbi, B., Siffroi, J.-P., Huhtaniemi, I., Fenichel, P., et al. (2003). Sequestration of connexin43 in the early endosomes: an early event of Leydig cell tumor progression. *Mol. Carcinog.* 38, 179–187.
- Sekido, R., Bar, I., Narváez, V., Penny, G., and Lovell-Badge, R. (2004). SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev. Biol.* 274, 271–279.
- Seminara, S.B., Achermann, J.C., Genel, M., Jameson, J.L., and Crowley, W.F. (1999). X-Linked Adrenal Hypoplasia Congenita: A Mutation in DAX1 Expands the Phenotypic Spectrum in Males and Females. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 4501–4509.
- Seol, W., Choi, H.S., and Moore, D.D. (1995). Isolation of proteins that interact specifically with the retinoid X receptor: two novel orphan receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 9, 72–85.
- Seong, K.-H., Li, D., Shimizu, H., Nakamura, R., and Ishii, S. (2011). Inheritance of Stress-Induced, ATF-2-Dependent Epigenetic Change. *Cell* 145, 1049–1061.
- Setarehbadi, R., Vatannejad, A., Vaisi-Raygani, A., Amiri, I., Esfahani, M., Fattahi, A., and Tavailani, H. (2012). Apolipoprotein E genotypes of fertile and infertile men. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 263–267.
- Seward, D.J., Koh, A.S., Boyer, J.L., and Ballatori, N. (2003). Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OST α -OST β . *J. Biol. Chem.* 278, 27473–27482.
- Shang, E., Nickerson, H.D., Wen, D., Wang, X., and Wolgemuth, D.J. (2007). The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Dev. Camb. Engl.* 134, 3507–3515.
- Sharma, G., Hu, C., Brigman, J.L., Zhu, G., Hathaway, H.J., and Prossnitz, E.R. (2013). GPER deficiency in male mice results in insulin resistance, dyslipidemia, and a proinflammatory state. *Endocrinology* 154, 4136–4145.

- Sharma, T.P., Blache, D., Blackberry, M.A., and Martin, G.B. (1999). Role of peripheral and central aromatization in the control of gonadotrophin secretion in the male sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* *11*, 293–302.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., and Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* *125*, 769–784.
- Shaw, R.J., Lamia, K.A., Vasquez, D., Koo, S.-H., Bardeesy, N., Depinho, R.A., Montminy, M., and Cantley, L.C. (2005). The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* *310*, 1642–1646.
- Sheng, K., Liang, X., Huang, S., and Xu, W. (2014). The role of histone ubiquitination during spermatogenesis. *BioMed Res. Int.* *2014*, 870695.
- Shima, T., Tada, H., Morimoto, M., Nakagawa, Y., Obata, H., Sasaki, T., Park, H., Nakajo, S., Nakashima, T., Okanou, T., et al. (2000). Serum total bile acid level as a sensitive indicator of hepatic histological improvement in chronic hepatitis C patients responding to interferon treatment. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *15*, 294–299.
- Short, M.L., Huang, D., Milkowski, D.M., Short, S., Kunstman, K., Soong, C.J., Chung, K.C., and Jungmann, R.A. (1994). Analysis of the rat lactate dehydrogenase A subunit gene promoter/regulatory region. *Biochem. J.* *304* (Pt 2), 391–398.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V., Scrimo, P.J., and Merchenthaler, I. (1998). Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER- α) and β (ER- β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* *63*, 498–504.
- Sigillo, F., Guillou, F., Fontaine, I., Benahmed, M., and Le Magueresse-Battistoni, B. (1999). In vitro regulation of rat Sertoli cell transferrin expression by tumor necrosis factor alpha and retinoic acid. *Mol. Cell. Endocrinol.* *148*, 163–170.
- Silveira, M.-G., and Lindor, K.-D. (2008). Clinical features and management of primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol. WJG* *14*, 3338–3349.
- Singh, J., and Handelsman, D.J. (1996). The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J. Androl.* *17*, 382–393.
- Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V., and Rainey, W.E. (2002). Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* *174*, R13–R17.
- Sirianni, R., Chimento, A., Ruggiero, C., De Luca, A., Lappano, R., Andò, S., Maggiolini, M., and Pezzi, V. (2008). The novel estrogen receptor, G protein-coupled receptor 30, mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol on mouse spermatogonial GC-1 cell line. *Endocrinology* *149*, 5043–5051.
- Siu, M.K.Y., and Cheng, C.Y. (2004). Interactions of Proteases, Protease Inhibitors, and the β 1 Integrin/Laminin γ 3 Protein Complex in the Regulation of Ectoplasmic Specialization Dynamics in the Rat Testis. *Biol. Reprod.* *70*, 945–964.

- Siu, E.R., Wong, E.W.P., Mruk, D.D., Sze, K.L., Porto, C.S., and Cheng, C.Y. (2009). An Occludin-Focal Adhesion Kinase Protein Complex at the Blood-Testis Barrier: A Study Using the Cadmium Model. *Endocrinology* 150, 3336–3344.
- Siu, M.K.Y., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2003). The interplay of collagen IV, tumor necrosis factor- α , gelatinase B (matrix metalloprotease-9), and tissue inhibitor of metalloproteases-1 in the basal lamina regulates Sertoli cell-tight junction dynamics in the rat testis. *Endocrinology* 144, 371–387.
- Skinner, M.K., and Griswold, M.D. (1982). Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells is regulated by hormones and retinoids. *Biol. Reprod.* 27, 211–221.
- Skinner, M.K., Tung, P.S., and Fritz, I.B. (1985). Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.* 100, 1941–1947.
- Slama, R., Hansen, O.K.H., Ducot, B., Bohet, A., Sorensen, D., Allemand, L.G., Eijkemans, M.J.C., Rosetta, L., Thalabard, J.C., Keiding, N., et al. (2012). Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. *Hum. Reprod.* des070.
- Smit, J.J., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M., and van Roon, M.A. (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75, 451–462.
- Smith, R.L. (1974). Biliary excretion and hepatotoxicity of contraceptive steroids. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh.)* 185, 149–168.
- Smith, A., and Haaf, T. (1998). DNA nicks and increased sensitivity of DNA to fluorescence in situ end labeling during functional spermiogenesis. *BioTechniques* 25, 496–502.
- Smith, L.P., Nierstenhoefer, M., Yoo, S.W., Penzias, A.S., Tobiasch, E., and Usheva, A. (2009). The Bile Acid Synthesis Pathway Is Present and Functional in the Human Ovary. *PLoS ONE* 4, e7333.
- Song, K.-H., and Chiang, J.Y.L. (2006). Glucagon and cAMP inhibit cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) gene expression in human hepatocytes: discordant regulation of bile acid synthesis and gluconeogenesis. *Hepatology* 43, 117–125.
- Song, C.-H., Gong, E.-Y., Park, J. soo, and Lee, K. (2012). Testicular steroidogenesis is locally regulated by androgen via suppression of Nur77. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 422, 327–332.
- Song, K.-H., Park, Y.-Y., Park, K.C., Hong, C.Y., Park, J.H., Shong, M., Lee, K., and Choi, H.-S. (2004). The Atypical Orphan Nuclear Receptor DAX-1 Interacts with Orphan Nuclear Receptor Nur77 and Represses Its Transactivation. *Mol. Endocrinol.* 18, 1929–1940.
- Song, X., Vasilenko, A., Chen, Y., Valanejad, L., Verma, R., Yan, B., and Deng, R. (2014). Transcriptional dynamics of bile salt export pump during pregnancy: Mechanisms and implications in intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Hepatology* 59, 100–110.
- Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M., and Steger, K. (2002). Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia* 34, 384–390.

- Sonoda, J., Xie, W., Rosenfeld, J.M., Barwick, J.L., Guzelian, P.S., and Evans, R.M. (2002). Regulation of a xenobiotic sulfonation cascade by nuclear pregnane X receptor (PXR). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 13801–13806.
- Staessen, J.A., Nawrot, T., Hond, E.D., Thijs, L., Fagard, R., Hoppenbrouwers, K., Koppen, G., Nelen, V., Schoeters, G., Vanderschueren, D., et al. (2001). Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *The Lancet* 357, 1660–1669.
- Staudinger, J.L., Goodwin, B., Jones, S.A., Hawkins-Brown, D., MacKenzie, K.I., LaTour, A., Liu, Y., Klaassen, C.D., Brown, K.K., Reinhard, J., et al. (2001). The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3369–3374.
- Steger, K. (1999). Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol. (Berl.)* 199, 471–487.
- Stinton, L.M., and Shaffer, E.A. (2012). Epidemiology of gallbladder disease: cholelithiasis and cancer. *Gut Liver* 6, 172–187.
- Stocco, D.M. (1997). The steroidogenic acute regulatory (StAR) protein two years later. An update. *Endocrine* 6, 99–109.
- Suárez-Quian, C.A., Martínez-García, F., Nistal, M., and Regadera, J. (1999). Androgen Receptor Distribution in Adult Human Testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 350–358.
- Subramaniam, A., Singh, R., Tilak, P., Devi, R., Kulandaivelu, M., and Kumarasamy, T. (2013). Androgen insensitivity syndrome: ten years of our experience. *Front. Biosci. Elite Ed.* 5, 779–784.
- Suchy, F.J., Bucuvalas, J.C., and Novak, D.A. (1987). Determinants of bile formation during development: ontogeny of hepatic bile acid metabolism and transport. *Semin. Liver Dis.* 7, 77–84.
- Suire, S., Fontaine, I., and Guillou, F. (1995). Follicle stimulating hormone (FSH) stimulates transferrin gene transcription in rat Sertoli cells: cis and trans-acting elements involved in FSH action via cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on the transferrin gene. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 9, 756–766.
- Sultan, C., Lobaccaro, J.M., Belon, C., Terraza, A., and Lumbroso, S. (1992). Molecular Biology of Disorders of Sex Differentiation. *Horm. Res.* 38, 105–113.
- Summerfield, J.A., Cullen, J., Barnes, S., and Billing, B.H. (1977). Evidence for renal control of urinary excretion of bile acids and bile acid sulphates in the cholestatic syndrome. *Clin. Sci. Mol. Med.* 52, 51–65.
- Suwanichkul, A., DePaolis, L.A., Lee, P.D., and Powell, D.R. (1993). Identification of a promoter element which participates in cAMP-stimulated expression of human insulin-like growth factor-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* 268, 9730–9736.
- Swain, A., Narvaez, V., Burgoyne, P., Camerino, G., and Lovell-Badge, R. (1998). Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. *Nature* 391, 761–767.
- Szabó, P.E., and Pfeifer, G.P. (2012). H3K9me2 attracts PGC7 in the zygote to prevent Tet3-mediated oxidation of 5-methylcytosine. *J. Mol. Cell Biol.* mjs038.

- Tabarin, A., Achermann, J.C., Recan, D., Bex, V., Bertagna, X., Christin-Maitre, S., Ito, M., Jameson, J.L., and Bouchard, P. (2000). A novel mutation in DAX1 causes delayed-onset adrenal insufficiency and incomplete hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Invest.* 105, 321–328.
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A., and Nishimune, Y. (2002). Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech. Dev.* 113, 29–39.
- Tagliacozzi, D., Mozzi, A.F., Casetta, B., Bertucci, P., Bernardini, S., Di Ilio, C., Urbani, A., and Federici, G. (2003). Quantitative analysis of bile acids in human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry: a simple and rapid one-step method. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM FESCC* 41, 1633–1641.
- Tajima, Y., Watanabe, D., Koshimizu, U., Matsuzawa, T., and Nishimune, Y. (1995). Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- α stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. *Int. J. Androl.* 18, 8–12.
- Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., et al. (2009). Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol. Reprod.* 81, 155–164.
- Takikawa, H., Otsuka, H., Beppu, T., Seyama, Y., and Yamakawa, T. (1983). Serum concentrations of bile acid glucuronides in hepatobiliary diseases. *Digestion* 27, 189–195.
- Tan, K.A.L., De Gendt, K., Atanassova, N., Walker, M., Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K., Denolet, E., and Verhoeven, G. (2005). The role of androgens in sertoli cell proliferation and functional maturation: studies in mice with total or Sertoli cell-selective ablation of the androgen receptor. *Endocrinology* 146, 2674–2683.
- Tanaka, H., Iguchi, N., Isotani, A., Kitamura, K., Toyama, Y., Matsuoka, Y., Onishi, M., Masai, K., Maekawa, M., Toshimori, K., et al. (2005). HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7107–7119.
- Tanii, I., Yoshinaga, K., and Toshimori, K. (1999). Morphogenesis of the acrosome during the final steps of rat spermiogenesis with special reference to tubulobulbar complexes. *Anat. Rec.* 256, 195–201.
- Tarulli, G.A., Stanton, P.G., and Meachem, S.J. (2012). Is the Adult Sertoli Cell Terminally Differentiated? *Biol. Reprod.* 87, 13.
- Taylor, W.E., Najmabadi, H., Strathearn, M., Jou, N.T., Liebling, M., Rajavashisth, T., Chanai, N., Phung, L., and Bhasin, S. (1996). Human stem cell factor promoter deoxyribonucleic acid sequence and regulation by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in a Sertoli cell line. *Endocrinology* 137, 5407–5414.
- Van Thiel, D.H., Gavalier, J.S., Zajko, A.B., and Cobb, C.F. (1985). Consequences of complete bile-duct ligation on the pubertal process in the male rat. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 4, 616–621.
- Thomas, C., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2008a). Bile Acids and the Membrane Bile Acid Receptor TGR5—Connecting Nutrition and Metabolism. *Thyroid* 18, 167–174.
- Thomas, C., Pellicciari, R., Pruzanski, M., Auwerx, J., and Schoonjans, K. (2008b). Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 678–693.

- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1998). Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev.* *12*, 3693–3702.
- Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M.I., Shirley, C.R., Meistrich, M.L., Ballescà, J.L., and Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* *21*, 2084–2089.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Direct Association of the Gap Junction Protein Connexin-43 with ZO-1 in Cardiac Myocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 12725–12731.
- Trasler, J.M., Hake, L.E., Johnson, P.A., Alcivar, A.A., Millette, C.F., and Hecht, N.B. (1990). DNA methylation and demethylation events during meiotic prophase in the mouse testis. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 1828–1834.
- Trauner, M., and Boyer, J.L. (2002). Cholestatic syndromes. *Curr. Opin. Gastroenterol.* *18*, 314–329.
- Trauner, M., Fickert, P., and Stauber, R.E. (1999). Inflammation-induced cholestasis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* *14*, 946–959.
- Trottier, J., Białek, A., Caron, P., Straka, R.J., Milkiewicz, P., and Barbier, O. (2011). Profiling circulating and urinary bile acids in patients with biliary obstruction before and after biliary stenting. *PloS One* *6*, e22094.
- Tsochatzis, E.A., Bosch, J., and Burroughs, A.K. (2014). Liver cirrhosis. *The Lancet* *383*, 1749–1761.
- Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 285–293.
- Turgeon, D., Carrier, J.S., Lévesque, E., Hum, D.W., and Bélanger, A. (2001). Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members. *Endocrinology* *142*, 778–787.
- Upadhyay, R.D., Kumar, A.V., Ganeshan, M., and Balasinar, N.H. (2012). Tubulobulbar complex: cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* *10*, 27.
- Urban, R.J., Bodenbun, Y.H., Gilkison, C., Foxworth, J., Coggan, A.R., Wolfe, R.R., and Ferrando, A. (1995). Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am. J. Physiol.* *269*, E820–E826.
- Urizar, N.L., and Moore, D.D. (2003). GUGULIPID: a natural cholesterol-lowering agent. *Annu. Rev. Nutr.* *23*, 303–313.
- Urizar, N.L., Liverman, A.B., Dodds, D.T., Silva, F.V., Ordentlich, P., Yan, Y., Gonzalez, F.J., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., and Moore, D.D. (2002). A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for FXR. *Science* *296*, 1703–1706.
- Vaid, K.S., Guttman, J.A., Babyak, N., Deng, W., McNiven, M.A., Mochizuki, N., Finlay, B.B., and Vogl, A.W. (2007). The role of dynamin 3 in the testis. *J. Cell. Physiol.* *210*, 644–654.

- Valentini, L., Gläser, S., Schuetz, T., Omar, A., Kasim, E., Kroencke, T., Tietge, U.J.F., Lochs, H., Schulzke, J.-D., Brabant, G., et al. (2013). Serum bile acids and leptin interact with glucose metabolism in patients with liver cirrhosis. *Clin. Nutr.* 32, 122–129.
- Valli, H., Phillips, B.T., Shetty, G., Byrne, J.A., Clark, A.T., Meistrich, M.L., and Orwig, K.E. (2014). Germline stem cells: toward the regeneration of spermatogenesis. *Fertil. Steril.* 101, 3–13.
- Vassileva, G., Golovko, A., Markowitz, L., Abbondanzo, S.J., Zeng, M., Yang, S., Hoos, L., Tetzloff, G., Levitan, D., Murgolo, N.J., et al. (2006). Targeted deletion of Gpbar1 protects mice from cholesterol gallstone formation. *Biochem. J.* 398, 423.
- Vassileva, G., Hu, W., Hoos, L., Tetzloff, G., Yang, S., Liu, L., Kang, L., Davis, H.R., Hedrick, J.A., Lan, H., et al. (2010). Gender-dependent effect of Gpbar1 genetic deletion on the metabolic profiles of diet-induced obese mice. *J. Endocrinol.* 205, 225–232.
- Vaucher, L., Funaro, M.G., Mehta, A., Mielnik, A., Bolyakov, A., Prossnitz, E.R., Schlegel, P.N., and Paduch, D.A. (2014). Activation of GPER-1 Estradiol Receptor Downregulates Production of Testosterone in Isolated Rat Leydig Cells and Adult Human Testis. *PLoS ONE* 9, e92425.
- Verhoeven, G., and Cailleau, J. (1988). Follicle-Stimulating-Hormone and Androgens Increase the Concentration of the Androgen Receptor in Sertoli Cells. *Endocrinology* 122, 1541–1550.
- Viennois, E., Pommier, A.J.C., Mouzat, K., Oumeddour, A., El Hajjaji, F.-Z., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M.A. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.
- Volle, D.H., Duggavathi, R., Magnier, B.C., Houten, S.M., Cummins, C.L., Lobaccaro, J.-M.A., Verhoeven, G., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). The small heterodimer partner is a gonadal gatekeeper of sexual maturation in male mice. *Genes Dev.* 21, 303–315.
- Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A., and Suarez-Quian, C.A. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134, 2307–2316.
- De Vries, M., Ramos, L., Housein, Z., and De Boer, P. (2012). Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis. *Biol. Open* 1, 446–457.
- Waeber, G., Meyer, T.E., LeSieur, M., Hermann, H.L., Gérard, N., and Habener, J.F. (1991). Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 5, 1418–1430.
- Wagner, M., Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Guo, G.L., Schuetz, J.D., Gonzalez, F.J., et al. (2003). Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct-ligated mice. *Gastroenterology* 125, 825–838.
- Wagner, M., Zollner, G., and Trauner, M. (2011). Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology* 53, 1023–1034.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L.C., and Forman, B.M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol. Cell* 3, 543–553.

- Wang, S., Lai, K., Moy, F.J., Bhat, A., Hartman, H.B., and Evans, M.J. (2006). The nuclear hormone receptor farnesoid X receptor (FXR) is activated by androsterone. *Endocrinology* 147, 4025–4033.
- Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Wang, M., Yu, D., Forman, B.M., and Huang, W. (2008). Farnesoid X receptor antagonizes nuclear factor kappaB in hepatic inflammatory response. *Hepatology* 48, 1632–1643.
- Wang, Y.-D., Chen, W.-D., Yu, D., Forman, B.M., and Huang, W. (2011). The G-protein-coupled bile acid receptor, Gpbar1 (TGR5), negatively regulates hepatic inflammatory response through antagonizing nuclear factor κ light-chain enhancer of activated B cells (NF- κ B) in mice. *Hepatology* 54, 1421–1432.
- Wang, Z.J., Jeffs, B., Ito, M., Achermann, J.C., Yu, R.N., Hales, D.B., and Jameson, J.L. (2001a). Aromatase (Cyp19) expression is up-regulated by targeted disruption of Dax1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7988–7993.
- Wang, Z.N., Bassett, M., and Rainey, W.E. (2001b). Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 beta-hydroxylase. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 255–258.
- Ward, W.S., and Coffey, D.S. (1991). DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol. Reprod.* 44, 569–574.
- Watanabe, D., Suetake, I., Tajima, S., and Hanaoka, K. (2004a). Expression of Dnmt3b in mouse hematopoietic progenitor cells and spermatogonia at specific stages. *Gene Expr. Patterns* 5, 43–49.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D.J., Heyman, R.A., Moore, D.D., and Auwerx, J. (2004b). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113, 1408–1418.
- Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., et al. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439, 484–489.
- Watanabe, T., Tomizawa, S., Mitsuya, K., Totoki, Y., Yamamoto, Y., Kuramochi-Miyagawa, S., Iida, N., Hoki, Y., Murphy, P.J., Toyoda, A., et al. (2011). Role for piRNAs and Noncoding RNA in de Novo DNA Methylation of the Imprinted Mouse Rasgrf1 Locus. *Science* 332, 848–852.
- Watanapa, P. (1996). Recovery patterns of liver function after complete and partial surgical biliary decompression. *Am. J. Surg.* 171, 230–234.
- Waxman, D.J. (1988). Interactions of hepatic cytochromes P-450 with steroid hormones. Regioselectivity and stereospecificity of steroid metabolism and hormonal regulation of rat P-450 enzyme expression. *Biochem. Pharmacol.* 37, 71–84.
- Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V., and Peterson, R.N. (1983). Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ-cell relationships. *Am. J. Anat.* 167, 163–179.
- Weber, R.F.A., Dohle, G.R., and Romijn, J.C. (2005). Clinical laboratory evaluation of male subfertility. *Adv. Clin. Chem.* 40, 317–364.

- Wei, Y., Yang, C.-R., Wei, Y.-P., Zhao, Z.-A., Hou, Y., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2014). Paternally induced transgenerational inheritance of susceptibility to diabetes in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 1873–1878.
- Weider, K., Bergmann, M., and Brehm, R. (2011). Connexin 43: its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis. *Histol. Histopathol.* *26*, 1343–1352.
- Western, P.S., Miles, D.C., van den Bergen, J.A., Burton, M., and Sinclair, A.H. (2008). Dynamic regulation of mitotic arrest in fetal male germ cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 339–347.
- Whitby, R.J., Stec, J., Blind, R.D., Dixon, S., Leesnitzer, L.M., Orband-Miller, L.A., Williams, S.P., Willson, T.M., Xu, R., Zuercher, W.J., et al. (2011). Small molecule agonists of the orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) and liver receptor homologue-1 (LRH-1, NR5A2). *J. Med. Chem.* *54*, 2266–2281.
- Wikström, A.M., Raivio, T., Hadziselimovic, F., Wikström, S., Tuuri, T., and Dunkel, L. (2004). Klinefelter Syndrome in Adolescence: Onset of Puberty Is Associated with Accelerated Germ Cell Depletion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *89*, 2263–2270.
- Wilson, E.M., and French, F.S. (1976). Binding properties of androgen receptors. Evidence for identical receptors in rat testis, epididymis, and prostate. *J. Biol. Chem.* *251*, 5620–5629.
- Wilson, J., George, F., and Griffin, J. (1981). The hormonal control of sexual development. *Science* *211*, 1278–1284.
- Wilson, J.D., Griffin, J.E., and George, F.W. (1980). Sexual differentiation: early hormone synthesis and action. *Biol. Reprod.* *22*, 9–17.
- Winston, F., and Allis, C.D. (1999). The bromodomain: a chromatin-targeting module? *Nat. Struct. Biol.* *6*, 601–604.
- Wong, C., and Cheng, C.Y. (2005). The Blood-Testis Barrier: Its Biology, Regulation, and Physiological Role in Spermatogenesis. In *Current Topics in Developmental Biology*, Gerald P. Schatten, ed. (Academic Press), pp. 263–296.
- Wong, E.W.P., Mruk, D.D., and Cheng, C.Y. (2008). Biology and regulation of ectoplasmic specialization, an atypical adherens junction type, in the testis. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 692–708.
- Wouters-Tyrou, D., Martinage, A., Chevaillier, P., and Sautière, P. (1998). Nuclear basic proteins in spermiogenesis. *Biochimie* *80*, 117–128.
- Wu, J., Xia, C., Meier, J., Li, S., Hu, X., and Lala, D.S. (2002). The hypolipidemic natural product guggulsterone acts as an antagonist of the bile acid receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *16*, 1590–1597.
- Wu, T., Bound, M.J., Standfield, S.D., Gedulin, B., Jones, K.L., Horowitz, M., and Rayner, C.K. (2013). Effects of rectal administration of taurocholic acid on glucagon-like peptide-1 and peptide YY secretion in healthy humans. *Diabetes Obes. Metab.* *15*, 474–477.
- Wykes, S.M., and Krawetz, S.A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.* *278*, 29471–29477.

- Xia, W., and Cheng, C.Y. (2005). TGF-beta3 regulates anchoring junction dynamics in the seminiferous epithelium of the rat testis via the Ras/ERK signaling pathway: An in vivo study. *Dev. Biol.* 280, 321–343.
- Xiang, X., Han, Y., Neuvonen, M., Laitila, J., Neuvonen, P.J., and Niemi, M. (2010). High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of bile acid concentrations in human plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 878, 51–60.
- Xiao, X., Mruk, D.D., Wong, C.K.C., and Cheng, C.Y. (2014). Germ Cell Transport Across the Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis. *Physiology* 29, 286–298.
- Xie, W., Radominska-Pandya, A., Shi, Y., Simon, C.M., Nelson, M.C., Ong, E.S., Waxman, D.J., and Evans, R.M. (2001). An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3375–3380.
- Xiong, W., Wang, H., Wu, H., Chen, Y., and Han, D. (2009). Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction* 137, 469–479.
- Xu, Q., Lin, H.-Y., Yeh, S.-D., Yu, I.-C., Wang, R.-S., Chen, Y.-T., Zhang, C., Altuwaijri, S., Chen, L.-M., Chuang, K.-H., et al. (2007). Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* 32, 96–106.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J., and Fukamizu, A. (2004). Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J. Biol. Chem.* 279, 23158–23165.
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. (2008). Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat. Genet.* 40, 1016–1022.
- Yamazaki, M., Miyake, M., Sato, H., Masutomi, N., Tsutsui, N., Adam, K.-P., Alexander, D.C., Lawton, K.A., Milburn, M.V., Ryals, J.A., et al. (2013). Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 79–89.
- Yan, H.H.N., and Cheng, C.Y. (2006). Laminin alpha 3 forms a complex with beta3 and gamma3 chains that serves as the ligand for alpha 6beta1-integrin at the apical ectoplasmic specialization in adult rat testes. *J. Biol. Chem.* 281, 17286–17303.
- Yan, H.H.N., Mruk, D.D., Wong, E.W.P., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2008a). An autocrine axis in the testis that coordinates spermiogenesis and blood–testis barrier restructuring during spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 8950–8955.
- Yan, H.H.N., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2008b). Cross-talk between tight and anchoring junctions-lesson from the testis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 234–254.
- Yan, H.H.N., Mruk, D.D., Lee, W.M., and Cheng, C.Y. (2008c). Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 1945–1959.
- Yang, F., Huang, X., Yi, T., Yen, Y., Moore, D.D., and Huang, W. (2007a). Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res.* 67, 863–867.

- Yang, J.I., Yoon, J.-H., Myung, S.J., Gwak, G.-Y., Kim, W., Chung, G.E., Lee, S.H., Lee, S.-M., Kim, C.Y., and Lee, H.-S. (2007b). Bile acid-induced TGR5-dependent c-Jun-N terminal kinase activation leads to enhanced caspase 8 activation in hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 156–161.
- Yao, P.-L., Lin, Y.-C., and Richburg, J.H. (2010). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol. Reprod.* 82, 516–527.
- Yasuda, H., Hirata, S., Inoue, K., Mashima, H., Ohnishi, H., and Yoshida, M. (2007). Involvement of membrane-type bile acid receptor M-BAR/TGR5 in bile acid-induced activation of epidermal growth factor receptor and mitogen-activated protein kinases in gastric carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 154–159.
- Ye, L., Liu, S., Wang, M., Shao, Y., and Ding, M. (2007). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 860, 10–17.
- Yefimova, M.G., Sow, A., Fontaine, I., Guilleminot, V., Martinat, N., Crepieux, P., Canepa, S., Maurel, M.-C., Fouchécourt, S., Reiter, E., et al. (2008). Dimeric transferrin inhibits phagocytosis of residual bodies by testicular rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.* 78, 697–704.
- Yoon, B.J., Herman, H., Sikora, A., Smith, L.T., Plass, C., and Soloway, P.D. (2002). Regulation of DNA methylation of Rasgrf1. *Nat. Genet.* 30, 92–96.
- Yu, J., Lo, J.-L., Huang, L., Zhao, A., Metzger, E., Adams, A., Meinke, P.T., Wright, S.D., and Cui, J. (2002). Lithocholic acid decreases expression of bile salt export pump through farnesoid X receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* 277, 31441–31447.
- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A., and Jameson, J.L. (1998). Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat. Genet.* 20, 353–357.
- Zalenskaya, I.A., Bradbury, E.M., and Zalensky, A.O. (2000). Chromatin structure of telomere domain in human sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 213–218.
- Zanaria, E., Muscatelli, F., Bardoni, B., Strom, T.M., Guioli, S., Guo, W., Lalli, E., Moser, C., Walker, A.P., McCabe, E.R.B., et al. (1994). An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 372, 635–641.
- Zhang, M., and Chiang, J.Y. (2001). Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J. Biol. Chem.* 276, 41690–41699.
- Zhang, Y., Kast-Woelbern, H.R., and Edwards, P.A. (2003). Natural structural variants of the nuclear receptor farnesoid X receptor affect transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 278, 104–110.
- Zhang, Y., Castellani, L.W., Sinal, C.J., Gonzalez, F.J., and Edwards, P.A. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* 18, 157–169.
- Zhang, Y., Lee, F.Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F.J., Willson, T.M., and Edwards, P.A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1006–1011.

- Zhang, Y., Jurkowska, R., Soeroes, S., Rajavelu, A., Dhayalan, A., Bock, I., Rathert, P., Brandt, O., Reinhardt, R., Fischle, W., et al. (2010). Chromatin methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3a/3L is guided by interaction of the ADD domain with the histone H3 tail. *Nucleic Acids Res.* 38, 4246–4253.
- Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R., and Meistrich, M.L. (2004). Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genes. N. Y. N* 2000 38, 200–213.
- Zhong, M. (2010). TGR5 as a therapeutic target for treating obesity. *Curr. Top. Med. Chem.* 10, 386–396.
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S., and Hess, R.A. (2002). Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract. *J. Androl.* 23, 870–881.
- Zhou, X.-P., Hu, X.-L., Zhu, Y.-M., Qu, F., Sun, S.-J., and Qian, Y.-L. (2011). Comparison of semen quality and outcome of assisted reproductive techniques in Chinese men with and without hepatitis B. *Asian J. Androl.* 13, 465–469.
- Zofall, M., and Grewal, S.I.S. (2006). RNAi-mediated heterochromatin assembly in fission yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 487–496.
- Zollner, G., Fickert, P., Fuchsbichler, A., Silbert, D., Wagner, M., Arbeiter, S., Gonzalez, F.J., Marschall, H.-U., Zatloukal, K., Denk, H., et al. (2003). Role of nuclear bile acid receptor, FXR, in adaptive ABC transporter regulation by cholic and ursodeoxycholic acid in mouse liver, kidney and intestine. *J. Hepatol.* 39, 480–488.
- Zorgniotti, A.W., and Sealfon, A.I. (1988). Measurement of intrascrotal temperature in normal and subfertile men. *J. Reprod. Fertil.* 82, 563–566.

Résumé

Chez l'homme, des données cliniques décrivent une association entre des pathologies hépatiques et des désordres de la fertilité masculine. Plusieurs modèles expérimentaux de cholestase ont permis de confirmer ce lien et de souligner un impact sur la physiologie testiculaire. De manière intéressante, une telle corrélation existe aussi bien à l'âge adulte que dans des modèles animaux en période pré-pubertaire. Pour autant, le lien moléculaire pouvant expliquer cette association physiopathologique n'a pas été exploré.

L'ensemble des hépatopathies a pour dénominateur commun une augmentation des taux plasmatiques d'acides biliaires et ce dès les stades les plus précoces de la maladie. Dans ce contexte, l'hypothèse de l'impact délétère des acides biliaires sur la fonction reproductrice reste à définir.

Notre projet de recherche s'articule autour de l'analyse d'un modèle murin d'atteinte hépatique induite par un régime supplémenté en acide cholique. Nos résultats principaux montrent que : 1) lors d'une exposition pubertaire, l'activation supra-physiologique des signalisations $\text{Fxr}\alpha$ conduit à un défaut de maturation sexuelle associé à une altération de la fonction endocrine du testicule ; 2) dans un contexte d'exposition à l'âge adulte, l'activation excessive du récepteur membranaire Tgr5 par les acides biliaires est associée à une hypofertilité. Celle-ci s'accompagne d'une altération de la spermatogenèse consécutive à un détachement progressif de l'épithélium séminifère et à une apoptose spécifique des spermatides ; 3) enfin, nos conclusions démontrent pour la première fois l'impact transgénérationnel de l'exposition aux acides biliaires. Sur deux générations successives, les descendants des mâles adultes nourris par un régime supplémenté en acide cholique présentent des anomalies développementales et métaboliques. Dépendantes de l'action de Tgr5 , ces dernières sont attribuées à des altérations de l'épigénome des spermatozoïdes issus des mâles exposés aux acides biliaires.

En conclusion, nos données démontrent que, dans des conditions cholestatiques, les acides biliaires altèrent les fonctions de reproduction notamment par leurs impacts sur les fonctions testiculaires. Au regard du nombre croissant de personnes souffrant de troubles hépatiques, ces effets délétères des acides biliaires pourraient contribuer à l'augmentation de l'incidence de l'infertilité masculine. Des molécules agonistes des signalisations $\text{FXR}\alpha$ et TGR5 sont aujourd'hui envisagées dans le cadre du traitement de pathologies courantes de notre société. Dans ce contexte, notre étude permettra d'alerter les instances sanitaires quant aux conséquences de l'accès à de tels traitements sur la fertilité et la santé des générations futures.

Mots clefs : Acides biliaires, $\text{Fxr}\alpha$, Tgr5 , Physiologie testiculaire, Effets transgénérationnels

Abstract

Clinical data describe an association between liver diseases and disorders of male fertility. Several experimental models of cholestasis have confirmed this link and highlight an impact on testicular physiology. Interestingly, such correlation exists in adult as well as in during pre-pubertal animals. However, the molecular links have not been explored yet.

The increase of plasma bile acids levels is a common feature of liver diseases. In this context, the hypothesis of the deleterious impact of bile acids on reproductive function remains to be defined.

For that purpose, we used a mouse model of liver injury induced by a diet supplemented with cholic acid. Main results show that: 1) supra-physiological activation of $\text{Fxr}\alpha$, during pubertal period, alters endocrine function of the testis and then sexual maturation. 2) during adult age excessive activation of membrane receptor TGR5 by bile acids leads to subfertility. This is associated with impaired spermatogenesis due to a detachment of the seminiferous epithelium and specific apoptosis of spermatids. 3) Finally, we show for the first time the transgenerational impact of bile acid exposure. Two generations of progenies from males exposed to bile acid-diet show developmental and metabolic abnormalities. These effects, mediated by TGR5 , are correlated with alterations of the spermatozoa epigenome.

In conclusion, our data demonstrate that bile acids affect reproductive functions with impacts on testicular functions. In line with the increasing number of people with liver diseases, the deleterious effects of bile acids may contribute to the incidence of male infertility. Interestingly, agonists of $\text{FXR}\alpha$ and TGR5 are now considered in the treatment of several diseases. In this context, our study might alert health authorities regarding the potential consequences of these treatments on fertility and health futures generations.

Key words : Bile acids, $\text{Fxr}\alpha$, Tgr5 , Testis physiology, Transgenerational effects